

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-126447

(P2005-126447A)

(43) 公開日 平成17年5月19日 (2005.5.19)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

A 6 1 K 38/00

A 6 1 P 37/08

// C 0 7 K 14/415

F 1

A 6 1 K 37/02

A 6 1 P 37/08

C 0 7 K 14/415 Z N A

テーマコード (参考)

4 C 0 8 4

4 H 0 4 5

審査請求 有 請求項の数 33 O L (全 28 頁)

(21) 出願番号 特願2005-15427 (P2005-15427)  
 (22) 出願日 平成17年1月24日 (2005.1.24)  
 (62) 分割の表示 特願平9-531674の分割  
 原出願日 平成9年3月10日 (1997.3.10)  
 (31) 優先権主張番号 特願平8-80702  
 (32) 優先日 平成8年3月10日 (1996.3.10)  
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(71) 出願人 000006138  
 明治乳業株式会社  
 東京都江東区新砂1丁目2番10号  
 (74) 代理人 100102978  
 弁理士 清水 初志  
 (74) 代理人 100108774  
 弁理士 橋本 一憲  
 (72) 発明者 曾根 敏雄  
 神奈川県小田原市成田540番地 明治乳  
 業株式会社ヘルスサイエンス研究所内  
 (72) 発明者 桑 晃智  
 神奈川県小田原市成田540番地 明治乳  
 業株式会社ヘルスサイエンス研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アレルギー疾患に対するペプチド免疫療法剤

(57) 【要約】

【課題】 本発明は、異なる2種以上のアレルゲンに感受性のアレルギー患者にも有効なペプチド免疫療法剤を提供することを課題とする。

【解決手段】 本発明は、異なるアレルゲン分子由来のT細胞エпитープ領域をつなぎ合わせた1分子の多重エピトープペプチドを提供するものである。この多重エピトープの有効量を含むペプチド免疫療法剤は、広範囲のアレルギー疾患の予防及び治療に有効である。

【選択図】 なし

BEST AVAILABLE COPY

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

異なる T 細胞エпитープ領域を連結した 1 分子の直鎖状ポリペプチドであって、  
(1) 前記 T 細胞エпитープ領域の各々が前記アレルゲンに感受性の患者集団において測定した重要度指数が約 100 以上を示し、  
(2) 前記アレルゲンに対し感受性の患者集団の少なくとも 70% 以上の患者の末梢血リンパ球と反応し、  
(3) 前記アレルゲンに対する感受性の患者集団の IgE 抗体と実質的に反応しない、多重エпитープペプチドの有効量を含有することを特徴とする、ペプチド免疫療法剤。

## 【請求項 2】

異なる T 細胞エпитープ領域が 2 種以上の異なるアレルゲン分子に由来するものである、請求項 1 記載のペプチド免疫療法剤。

## 【請求項 3】

異なるアレルゲン分子がスギ花粉アレルゲン Cry j 1 および Cry j 2 である、請求項 2 記載のペプチド免疫療法剤。

## 【請求項 4】

各々の T 細胞エпитープ領域の間に抗原提示細胞内でプロセッシングを受ける部位を介在させた、請求項 1 記載のペプチド免疫療法剤。

## 【請求項 5】

抗原提示細胞内プロセッシングを受ける部位がアルギニンダイマーである、請求項 4 記載のペプチド免疫療法剤。

## 【請求項 6】

配列番号：1、配列番号：2 または配列番号：3 のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むペプチドである、請求項 3 記載のペプチド免疫療法剤。

## 【請求項 7】

HLA クラス II 分子 DRB5\*0101、DRB4\*0101、DQA1\*0102-DQB1\*0602、DPA1\*0101-DPB1\*0501 または DPA1\*0101-DPB1\*0201 の少なくとも 1 つを拘束分子とするエпитープを含む、請求項 3 記載のペプチド免疫療法剤。

## 【請求項 8】

異なるアレルゲン分子がスギ花粉アレルゲン Cry j 1 およびヒノキ花粉アレルゲン Cha 0 1 である請求項 2 記載のペプチド免疫療法剤。

## 【請求項 9】

配列番号：4、または配列番号：5 に記載のアミノ酸配列を含むペプチドである、請求項 8 記載のペプチド免疫療法剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、アレルギー疾患に対するペプチド免疫療法に有効な多重エпитープペプチドに関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

アレルギー疾患は、I 型過敏症 (hypersensitivity) 免疫反応、すなわち、IgE 抗体を介した I 型免疫反応が基盤となって生じた機能障害、あるいは障害による疾患群と定義される。その病態は、花粉症、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、アナフィラキシーショックなどである。花粉症は、アレルギー疾患の代表的疾患であり、我が国では、約 10% の人達がスギ花粉症に苦しめられているが、なお、その数は増加の一途をたどっている。米国では、ブタクサ花粉症の患者が 5~15% いると推測されている。このように花粉症は、その患者数が多いこと、眼のかゆみ、鼻水、くしゃみ、鼻づまり等のつらい症状を伴うこと、一度発病すると毎年繰り返すこと等から社会的、経済的にも大きな問題であり、根本的治療法の開発が切望されている。

10

20

30

40

50

## 【0003】

I型アレルギー反応の成立に関する研究は、アレルギー疾患の理解と治療にあたって重要である。現在、アレルゲン特異的免疫反応における初期の反応、特に、T細胞によるアレルギー反応制御のメカニズムの解明に焦点があてられている。アレルゲンを含む外来抗原に対する免疫反応の開始は、免疫システムの抗原提示細胞に依存する。B細胞、マクロファージ、および樹状細胞を含む抗原提示細胞は、外来抗原を取り込み、抗原ペプチド（T細胞エピトープペプチド）まで断片化してMHCクラスII分子（ヒトではHLAクラスII）のα鎖およびβ鎖で形成されるポケットに收容し、細胞表面に表現し、抗原特異的CD4陽性ヘルパーT細胞（Th細胞）に抗原提示する。HLAクラスII分子はDR、DQおよびDP分子からなり、DR分子のα鎖はHLA-DRA、β鎖はHLA-DRB1、-DRB3、-DRB4または-DRB5遺伝子によりコードされ、DQ分子のα鎖は、HLA-DQA1、β鎖はHLA-DQB1遺伝子によりコードされ、DP分子のα鎖はHLA-DPA1、β鎖はHLA-DPB1遺伝子によってコードされている。HLA-DRAを除く各々の遺伝子は多くの対立遺伝子を含み、抗原ペプチドを收容するポケットは高度の多型性を示し、その構造が微妙に異なる。その結果、ポケットに結合しT細胞に提示される抗原ペプチドの種類はおのずとその構造に制限される。

## 【0004】

HLAクラスII拘束性の抗原情報をT細胞レセプター(TCR)を介して受け取ったTh細胞は、活性化し、種々のサイトカインを分泌することにより自ら増殖するとともに、B細胞を形質細胞に分化させ、抗体産生を誘導する。抗原刺激によって活性化されたTh細胞は、サイトカインの産生パターンの相違によってインターロイキン2（IL-2）、インターフェロンγ（IFN-γ）、腫瘍壊死因子β（TNF-β）を産生するTh1細胞、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13を産生するTh2細胞、両方のサイトカインを産生するTh0細胞、に分類される。アレルギーの原因となるIgE抗体の産生は、IL-4、IL-13によって促進されるが、IFN-γによって抑制される。すなわち、Th1細胞はIgEの産生を抑制し、Th2細胞はそれを促進する。抗原の侵入に際し、Th1細胞が働くかTh2細胞が働くかでアレルギーの感作が生じるか否かが定まるともいえる。実際、アレルギー患者ではTh2細胞が優位に働いていることが知られている。アレルゲン特異的IgE抗体は、末梢血中の好塩基球および組織のマスト細胞に固着し、引き続くアレルゲンの侵入により、アレルゲンを介してIgE抗体が好塩基球やマスト細胞上で架橋し、その結果、ヒスタミン、プロスタグランジンおよびロイコトリエンを含む炎症性メディエーターが放出され、即時性アレルギー反応が引き起こされる。これらの炎症性メディエーターに応答して、局所に集積したリンパ球、単球、好塩基球、および好酸球が活性化され、組織に障害を含む様々な反応をもたらすメディエーターを遊離することにより遅発アレルギー反応が引き起こされる。

## 【0005】

抗原特異的にIgE抗体産生を抑制することで特定のアレルギーを治療しようとする試みの一つに、アレルゲンタンパク分子を用いた減感作療法がある。減感作療法は、薬物療法では得ることの出来ない長期にわたる持続効果があり、唯一の根本的治療に近いにもかかわらず、かならずしも一般的な治療法として認知されていないのが現状である。その理由として、この治療法に伴う副作用（局所の腫脹やアナフィラキシーショックなど）の危険性のほかに、この治療法がどうしても有効なのかその作用機序がいまだに不明である点があげられる。

## 【0006】

そこで登場したのがT細胞エピトープを有するペプチド抗原を用いた減感作の考え方である。この治療方法に用いられるアレルゲン分子上のT細胞エピトープを含むペプチド断片は、B細胞エピトープを含まない、あるいは含んでいても1価であり、マスト細胞の高親和性IgEレセプターをクロスリンクできない、などの理由により、患者に投与してもアナフィラキシーなどの副作用がおこらないと考えられる。さらに、T細胞エピトープを生体に投与すると、T細胞が抗原特異的に不活性化（アナジー、anergy）される現象が知られている（La Salle JM, et al.: J. Exp. Med. 176: 177-186, 1992）。このような理論

的背景のもとにネコの毛アレルゲンFel d 1の主要T細胞エピトープを含むペプチドを用いた減感作の動物実験が行われ、in vitroでT細胞アナジーが誘導されることが報告されており(Briner, T. J. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7608-7612, 1994)、現在このペプチドを用いた減感作の臨床試験が行われている(Norman, P. S. et al.: Am. J. Respir. Crit. Care Med. 154: 1623-1628, 1996; Simons, F. E. et al.: Int. Immunol. 8: 1937-1945, 1996)。このようなアレルゲン分子上の主要T細胞エピトープを含むペプチドを用いた減感作療法は「Peptide-based Immunotherapy」(ペプチド免疫療法あるいはペプチド減感作療法)と呼ばれている。

#### 【0007】

ペプチド免疫療法に用いるT細胞エピトープペプチドの選定基準として、重要度指数(Positivity Index: 平均T細胞刺激係数×出現頻度)が考案されている(国際公開第94/01560号)。また、ペプチドデザインに際して患者集団におけるHLAハプロタイプの多様性をカバーすべきであるとの報告がある(Wallner, B. P. & Geftner M. L.: Allergy, 49: 302-308, 1994)。

#### 【0008】

「T細胞エピトープまたはT細胞エピトープペプチド」とは、アレルゲン特異的T細胞の活性化能(例えば、サイトカイン産生やDNA合成としてとらえられる)を有するT細胞エピトープ、及び該エピトープを含む抗原ペプチドを意味する。

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0009】

アレルギー患者の中には異なる2種類以上のアレルゲン分子のそれぞれに特異的IgE抗体を持っている者が多い。このような患者にも有効なペプチド免疫療法剤を開発することはアレルギーの根本治療に必要である。しかしながらこれまでにこのような免疫療法剤は開発されてはならず、上記文献にもこのような発想は示されていない。従って、本発明は、異なる2種以上のアレルゲンに感受性のアレルギー患者にも有効なペプチド免疫療法剤を提供することを課題とする。

#### 【0010】

スギ花粉主要アレルゲンには、Cry j 1(Yasueda, H. et al.: J. Allergy Clin. Immunol. 71:77-86, 1983)及びCry j 2(Taniai, M. et al.: FEBS Letter 239: 329-332, 1988; Sakaguchi, M. et al.: Allergy, 45: 309-312, 1990)があるが、スギ花粉症患者の90%以上はCry j 1とCry j 2それぞれに対する特異的なIgE抗体をもっており、残り10%弱の患者は、Cry j 1又はCry j 2のどちらか一方に対する特異的IgE抗体をもっている(Hashimoto, M. et al.: Clin. Exp. Allergy 25:848-852, 1995)。従って、本発明者らは、スギ花粉症に対するペプチド免疫療法にCry j 1のみ、或いはCry j 2のみのT細胞エピトープを用いた場合には、患者の90%に対して十分な有効性は期待できないと考え、Cry j 1のT細胞エピトープ及びCry j 2のT細胞エピトープを同一分子内に含む多重エピトープを作製した。そして、当該多重エピトープペプチドがin vitroにおいて、花粉症患者のT細胞を活性化し、かつ当該患者のIgE抗体と反応せず、マウスを用いたin vivoにおいても免疫応答を誘導することを見出し、この新規な知見から、当該多重エピトープペプチドがスギ花粉症患者に対するペプチド免疫療法剤として有効であることが判明した。

#### 【0011】

更に、本発明者らはこの考え方を進展させて、スギ花粉症の症例では、ヒノキ花粉に対しても臨床症状を発現する例が多いことから、ヒノキ花粉アレルゲンCha o 1のT細胞エピトープ(特願平8-153527号)とスギ花粉アレルゲンCry j 1のT細胞エピトープとを同一分子内に含む多重エピトープを作製し、当該多重エピトープペプチドが、それぞれのT細胞エピトープには反応しないスギ花粉症患者及びヒノキ花粉症患者のT細胞を活性化することを見出した。これらの新規な知見に基づき、このような多重エピトープのデザインは、スギ花粉アレルゲン及びヒノキ花粉アレルゲンに限定されず他のさまざまなアレルゲン由来のT細胞エピトープに適用できることが判明した。

## 【0012】

さらにまた、より多くの患者に効果が期待されるように、多重エピトープをデザインする際のT細胞エピトープの選定基準として、患者集団（民族も含めて）におけるHLAハプロタイプを調査し、母集団におけるHLAハプロタイプの出現頻度が高いHLAに結合するエピトープをなるべく選択するように配慮すると共に、各エピトープがなるべく同一のHLAクラスII分子によって抗原提示されるものではなく、異なったタイプのHLAクラスII分子によって抗原提示されるT細胞エピトープペプチドを選定することにより、さらに有効対象患者を拡大させることを明らかにした。

【課題を解決するための手段】

## 【0013】

すなわち、本発明は、請求の範囲の各請求項に記載の発明からなる。

## 【0014】

以下に本発明をスギ花粉、或いはヒノキ花粉に感受性の患者、またはその双方に感受性の患者に有効な多重エピトープペプチドのデザインについて説明するが、本発明はこれらのアレルゲンに感受性の患者のみに限定されない。例えば、すでに一次構造が明らかにされている他のアレルゲン、例えば、ブタクサ（Amba1, Amba2, Amba5, Ambt5, Ambp5）、カモガヤ（Dacg2）、ホソムギ（Lolp1, Lolp2, Lolp3）などの草木花粉、ハンノキ（Alng1）、カバ（Betv1, Betv2）、マウンテンセダー（Juns1）、エンピツビャクシン（Junv1）などの樹木花粉、或いはその他ここに記載しないさまざまなアレルゲンにも本発明の技術思想は適用され得る。

## 【0015】

本明細書において、「多重エピトープペプチド」とは、異なるアレルゲン分子由来のT細胞エピトープが含まれているペプチド（抗原ペプチド又は単にペプチドともいう）を直鎖状に連結して1分子としたペプチドを意味する。また、T細胞エピトープを含むペプチド領域の間に、新たに認識されるエピトープ部位が生じる可能性を減少させるために、抗原提示細胞内で切断される領域を介在させることが好ましい。結果として、該切断領域で多重エピトープペプチドが個々の抗原ペプチドに切断されるので、個別の抗原ペプチドを混合物として投与した場合と同等の効果が期待される。なお、該切断領域は、生体内で切断を受ける限りはいかなる構造でもよいが、ライソゾームに含まれる酵素であるカテプシンBの認識配列であるアルギニンダイマーまたはリシンダイマーを用いることができる。

## 【0016】

本発明の多重エピトープペプチドデザインについて、スギ花粉アレルゲンCryj1およびCryj2を例として説明する。

## 【0017】

スギ花粉症患者末梢血リンパ球をCryj1またはCryj2で刺激し、患者ごとのT細胞ラインを作製する。Cryj1(国際公開第94/01560号)またはCryj2(Komiyama, N. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 201: 1201, 1994)の全一次構造をカバーする15アミノ酸程度のオーバーラッピングペプチドで患者から樹立したT細胞ラインを刺激することにより、Cryj1またはCryj2分子上でT細胞エピトープとして認識されるアミノ酸配列を同定する(図1、図2)。

## 【0018】

次に、これら抗原ペプチドと結合するHLAクラスII分子をタイピングする。

## 【0019】

ヒトの場合、HLAクラスII分子の遺伝子座には、DR、DQ及びDP分子が存在することが知られている。このことは、抗原を提示する抗原提示分子DR、DQ及びDPによりT細胞の分化が規定されている可能性を意味している。そのため、Cryj1またはCryj2の抗原ペプチドがどの遺伝子座由来の抗原提示分子で提示されるのか、また、DR、DQ、またはDP分子を介して抗原ペプチド情報を受け取ったT細胞は、Th1またはTh2細胞のどちらに分化しやすい傾向にあるのかを患者毎に樹立したT細胞クローンを用いて決定する(図3、4)。

## 【0020】

図3、4から、抗原ペプチドの刺激後のTh1、Th2またはTh0への分化は特定のエピトープ、特定のHLA分子の組み合わせでは規定されていないことが明らかである。すなわち、本発明の多重エピトープペプチドのデザインのためにペプチドを選定する場合には、最低限T細胞エピトープ部位を含むペプチドであれば、T細胞を刺激することができるため、抗原ペプチド選定の候補となり得る。

## 【0021】

多重エピトープペプチドデザインのためのペプチドを選定する基準は、(1)まず重要度指数(国際公開第94/01560号)の高い順番にペプチドを選定する(但し重要度指数は約100以上のものを選定する)、(2)出現頻度の高いHLAクラスII分子を抗原提示分子として選定する、(3)重要度指数にあまり差がない場合、有効性を上昇させるために、異なったタイプの拘束分子で提示されるペプチドを選定することである。つまりあるアレルギー疾患に対する当該アレルゲンのT細胞エピトープを選択するとき、ある集団のアレルギー患者のHLAハプロタイプの解析を行ない、かつその患者集団が属する母集団の当該HLAハプロタイプの遺伝子頻度の高いT細胞エピトープを選択するのが最も効果が期待される選択である。逆の言い方をすれば、このようにして選択したT細胞エピトープは他の集団では全く有効性が認められなくなる場合があることを意味している。

## 【0022】

例えばHLAハプロタイプのDPB1\*0501を例にすると、あるアレルギー疾患で日本人患者がこのHLAハプロタイプが高頻度で認められ、このHLAハプロタイプ拘束性のT細胞エピトープを選択したとする。一方こうして選択したペプチドは北アメリカ人で同じアレルギー疾患の患者に有効性はほとんど期待されない。なぜなら、このHLAハプロタイプは日本人集団での遺伝子頻度が39.0%と非常に高いが、北アメリカでの白人集団で1.3%、黒人集団で0.8%と非常に低いからである。北アメリカ人からHLA-DP拘束性のT細胞エピトープを選択するならDPB1\*0401(北アメリカ;白人30.2%、黒人11.1%、日本人;4.8%)等を選択すべきである。さらに、抗原提示分子がDR、DQ、DPというように異なる遺伝子座レベル、または遺伝子座が同一でも異なったハプロタイプの抗原提示分子で提示されるペプチドを選定することが重要である。

## 【0023】

この際、選定すべきエピトープ部位にシステイン残基が含まれていないことが好ましい。システイン残基がエピトープ部位に含まれていると、HLAクラスII分子に非特異的に結合する可能性があり、システイン残基を含む抗原ペプチドで免疫すると、本来は抗原ではない部位が、新たなエピトープとして認識される可能性がある。エピトープとして認識された場合には、2回目、3回目のペプチド投与により、システインを含むエピトープが認識され、副作用が現れる危険性が高くなると予測される。

## 【0024】

以下、多重エピトープデザインの具体例を示す。図1と図2に示したCry j 1とCry j 2の重要度指数を用いると、Cry j 1におけるT細胞エピトープの重要度指数は、ペプチド番号43番のアミノ酸番号211-225(以下p211-225と表示する)(拘束分子DPA1\*0101-DPB1\*0501)が一番高く、ペプチド番号22番p106-120(拘束分子DRB5\*0101)が2番目である。この2者は多重エピトープペプチドに使用する抗原ペプチドとして選定できる。また、Cry j 2における重要度指数は、ペプチド番号14番p66-80(拘束分子DRB5\*0101)と38番p186-200(DRB4\*0101)が高く同様に抗原ペプチドとして選定できる。Cry j 2のペプチド番号38番の前に位置するペプチド番号37番p181-195は、重要度指数が280であるが拘束分子がDPA1\*0101-DPB1\*0201であり、38番の拘束分子とは異なる。ペプチド37番p181-195はペプチド番号38番p186-200と10残基オーバーラップしており、38番の前に37番の4残基を付加し、HLA-DP分子拘束性のペプチドとして選択できる。これまで選定してきたペプチドの中にはDQ拘束性を示す抗原ペプチドは存在しない。Cry j 1のペプチド番号4番p16-30はDQA1\*0102-DQB1\*0602が拘束分子であるが、エピトープの中央にシステイン残基が含まれるため選定できない。Cry j 2のペプチド番号69~70番に該当するp341-360はDQA1\*0102-DQB1\*

0602 で提示されるペプチドであるが、これも70番のペプチドの中にはシステインが含まれている。しかし、システインを含まない69番のペプチドのみでもT細胞を活性化することができるため、12残基のみ、即ちp344-355 (ISLKLTSGLIAS) を選定できる。また、Cry j 1のペプチド番号22番p106-120は107番目にシステインを含むが、T細胞クローンを使用したT細胞エピトープのコア配列の決定によって最低必要な配列はp109-117 (FIKRVSNVI) (配列番号: 4) の9残基である。すなわち、p106-107番目のPro-Cys残基を除去しても使用することができる。

#### 【0025】

抗原提示細胞内に取り込まれた抗原はライソゾームで分解される。抗原提示分子に外来性の蛋白質が取り込まれ、どのようにプロセスされ、またどのように HLAクラスII分子に結合するかは未だに未解決のままである。しかしながら、現在では、この複雑な機構の中で抗原の切断にカテプシンBが関与している可能性が指摘されている (勝沼信彦、日本免疫学会(1995)25:75)。

#### 【0026】

幾つかの HLAクラスIIタイプに関しては、抗原ペプチドのHLA結合性アミノ酸モチーフが決定されてきている。HLAクラスII分子に対する結合は特異性を有するが、ある特定のHLAクラスIIタイプについても一定の法則を満たすペプチドであればかなりの種類の抗原ペプチドが結合できる (Rammensee, H.-G. et al. Immunogenetics. (1995) 41:178-228)。このため、抗原ペプチドをつなげた部位に、新たに認識されるエピトープ部位が生ずる可能性がある。これを避けるため、抗原ペプチドごとに抗原提示細胞内で切断されるように多重エピトープペプチドをデザインするのが好ましい。カテプシンBが認識するペプチド配列は疎水性アミノ酸-Arg-ArgまたはLys-Lysであるため、エピトープを含むペプチドの後半にArg-ArgまたはLys-Lysを付加し、次に続くエピトープ配列は Arg-ArgまたはLys-Lysに続いて疎水性アミノ酸配列が位置するように配置する。

#### 【0027】

この具体例の抗原ペプチドの配列の順番に関しては、抗原ペプチドの間にArg-Argを介在させたので、順番は問う必要がないと考えられるが、Cry j 2のペプチド番号14番 (図2) に関しては、このペプチドの後半にArgを接続すると、73番のTyrが第一アンカーとなり、付加したArg残基がDRB5\*0101のペプチド結合モチーフの9番目のアミノ酸となって第二アンカーとなる可能性がある。その結果、新たなエピトープとして認識される可能性がある。このため、この配列は多重エピトープペプチドの最後に位置するのが好ましい。

#### 【0028】

このようにして得られた多重エピトープペプチドを、配列番号: 1 に示す。この多重エピトープの拘束分子は、DRB4\*0101、DRB5\*0101、DPA1\*0101-DPB1\*0201、DPA1\*0101-DPB1\*0501、DQA1\*0102-DQB1\*0602である。第11回国際組織適合抗原会議において日本人集団におけるこれらの遺伝子頻度が計算されている (Tsuji, K. et al. HLA 1991 vol. 1 (1992) Oxford University Press)。DRB4\*0101は0.291、DRB5\*0101は0.056 (DRB5\*0102は0.070)、DPB1\*0201は0.208、DPB1\*0501は0.399、DQB1\*0602は0.053 (DQB1\*0601は0.204) と算出されている。この値から抗原頻度を計算するとDRB4\*0101=0.50、DRB5\*0101=0.11 (DRB5\*0102=0.14)、DPB1\*0201=0.37、DPB1\*0501=0.64 (Hori et al. の観察では0.79)、DQB1\*0602=0.10 (DQB1\*0601=0.37) と計算される。DRB5\*0101とDQB1\*0602には連鎖不平衡が存在するため同一とみなせるため、DRB5\*0101の値が使用できる。日本人集団でDPB1\*0201とDPB1\*0501の両タイプの両者または片方を所持する確率は0.85と計算される。また、DRB4\*0101とDRB5\*0101の両者または片方を所持する確率は0.56と計算される。この値から、配列番号: 1 の多重エピトープペプチドに含まれるT細胞エピトープを一箇所以上認識できる患者はおおよそ90%と見積もられる。しかしながら、これらのHLA-タイプを所持する患者においてもT細胞側でこれらの拘束分子で抗原情報が提示されてもこれらのエピトープペプチドを認識できるT細胞レパトリーが存在するかどうかは不明である。また、T細胞の増殖を引き起こすためのエピトープ数が未知である (2箇所以上必要である可能性がある) ため、この多重エピトープペプチドの有効率は下がると考えられる。実際には17名

の末梢血リンパ球の増殖応答での結果つまり、77%前後が妥当な値と予測される。

【0029】

さらに、有効対象人員を拡大させるために、T細胞エピトープをより多く含む多重エピトープペプチドをデザインすることもできる。例えば、Cry j 1のp213-225, p108-120, Cry j 2のp182-200, p79-98, Cry j 1のp80-95, Cry j 1のp66-80をこの順につないだ多重エピトープペプチド(配列番号: 2)、あるいは、Cry j 1のp213-225, p108-120, Cry j 2のp182-200, p79-98, Cry j 1のp67-95, Cry j 2のp238-251, p66-80をこの順につないだ多重エピトープペプチド(配列番号: 3)である。これらの多重エピトープペプチドは、調査したスギ花粉症患者21名全員の末梢血リンパ球を刺激し、患者IgE抗体と反応しないのでペプチド免疫療法剤として有効である。このような考え方をさらに進展させて、種の異なるアレルゲン例えば、ヒノキ花粉アレルゲンとスギ花粉アレルゲンのT細胞エピトープを実施例13に示す方法で作製し有効性の拡大をさらにはかることもできる。

【0030】

T細胞の活性を調節するために多重エピトープペプチドに使用する抗原ペプチド部分の改変を行なうことも本発明に含まれる。改変とは1残基以上のアミノ酸置換、欠失、挿入を行なうことである。抗原ペプチドのアミノ酸置換によってT細胞に与える質的な変化を調べることは既に知られている方法で行うことができる。例えば、本発明の多重エピトープペプチド中の特定のアミノ酸を、1) 類似したアミノ酸に置換する方法で、Asp を Glu に、Asn を Gln に、Lys を Arg に、Phe を Tyr に、Ile を Leu に、Gly を Ala に、Thr を Ser に置換したアナログペプチドを合成し、T細胞の増殖能、あるいはリンホカインの産生能等をもとのペプチドと比較する、2) 類似していないアミノ酸に置換する方法で、極性アミノ酸と親水性アミノ酸は疎水性アミノ酸である Ala に、疎水性アミノ酸は親水性アミノ酸である Ser に置換し、もとのペプチドと比較する。このようにして得られたアナログペプチドで、本発明の多重エピトープペプチドと免疫学的に等価(重要度指数、T細胞活性化能等)な多重エピトープペプチドも、本発明に包含される。

【0031】

Cry j 1 あるいは Cry j 2 由来の抗原ペプチドと反応するT細胞は Th2 と Th0 の性質を有するものが多い(図3、図4)。ところで、BCGワクチンは細胞性免疫能を賦活することによって結核菌からの感染を予防する。細胞性免疫を賦活させるためには Th1 タイプのT細胞を誘導しなければならないが、BCG接種したヒトのT細胞クローンの性質を検討すると Th1 タイプのT細胞が多いことが報告されている(松下 祥、第45回日本アレルギー学会、836頁、1995年)。松下の報告によれば、HLA-DR14(DRB1\*1405)拘束性に結核菌 BCGa 蛋白の84-100 アミノ酸配列 (EEYLILSARDVLAVVSK)を認識するTh1 クローンが存在する。そこで、日本人の60%以上が持っているHLAハプロタイプであるDPA1\*0101-DPB1\*0501 拘束性のT細胞エピトープを選択し(例えば図1のCry j 1 43番ペプチド(p211-225) / KSMKVTVAFNQFGPN)、このペプチドをDRB1\*1405 拘束性の結核菌 BCGa 蛋白の84-100 T細胞エピトープとつないだ多重エピトープペプチドEEYLILSARDVLAVVSKRRMKVTVAFNQFGPNは、DRB1\*1405 のハプロタイプを持つスギ花粉症患者に当たる確率はかなり高くなると考えられる。このような多重エピトープペプチドを用いれば、BCGa 抗原由来ペプチドによって Th1 のリンホカイン、特に IL-12 の産生が期待できる。IL-12はIL-4 と相反する作用を持ち、T細胞にはたらいて Th細胞の Th1 への分化を誘導することが多くのヒトおよびマウスの例で知られている(Manetti, R., et al.: J. Exp. Med., 177, 1199-1204, 1993; Wu, C., et al.: J. Immunol., 151, 1938-1949, 1993; Hsieh, C., et al.: Science, 260, 547-549, 1993)。特に、Manetti 等の実験結果ではダニアレルゲンの一つである Der p 1 抗原特異的なT細胞クローンは通常 Th2 が誘導されるが、IL-12 存在下では Th1 又は Th0 が誘導されるとされている。従って、Th1 誘導能を持つT細胞エピトープとアレルゲン反応性のT細胞エピトープを組み合わせた多重エピトープペプチドを用いることによって、本来 Th2 誘導性のT細胞が Th1 又は Th0 タイプのT細胞に誘導されることが期待される。

【0032】

10

20

30

40

50



本発明のCry j 1及び／又はCry j 2のT細胞エピトープを少なくとも一つ含むペプチドをマウスに皮下投与するとその後のスギ花粉アレルゲンに暴露された場合にT細胞アナジーが生じ（図13、14）、IL-2産生量も対照群に比較して有意に低下する。ヒトの減感作療法の際はIL-2が減少するとの報告(J. Allergy Clin. Immunol. 76: 188, 1985)がある。さらに、本発明の多重エピトープペプチドは、当該ペプチドを構成する各T細胞エピトープペプチドに対するT細胞クローンのそれぞれを活性化し（図10）、かつ患者IgE抗体と反応しない（図8）。これらの結果は、本発明の多重エピトープペプチドがアレルゲンに対して免疫寛容を誘導し、アレルギー疾患のペプチド免疫療法剤としての有用性を示すものである。本発明多重エピトープペプチドは製薬学的に許容し得る担体または希釈剤と共に投与することができる。その有効量は、スギ花粉アレルゲンに対する感受性の程度、年齢、性別及び患者の体重、並びに患者における免疫応答を引き出すペプチドの能力などの因子に従って変化する。

#### 【0033】

投与経路は、注射（皮下、静脈内）、点鼻、点眼、経口、吸入、経皮などの簡便な方法で投与することができる。

#### 【0034】

なお、本明細書及び配列表におけるアミノ酸の1文字記号による表記は、IUPAC生化学命名委員会によって制定された表記とする（生化学辞典（第2版）1468頁表1.1参照）。

#### 【実施例1】

#### 【0035】

T細胞ラインを用いたCry j 1及びCry j 2のT細胞エピトープの同定

18名のスギ花粉症患者末梢血リンパ球を、スギ花粉アレルゲンであるCry j 1またはCry j 2で刺激して、各アレルゲンを特異的に認識するT細胞ラインを患者別に樹立した。

#### 【0036】

96-ウエル平板培養プレート上で、マイトマイシンC処理した $5 \times 10^4$ 個の自己由来B細胞株、 $2 \mu\text{M}$ のオーバーラッピングペプチド、 $2 \times 10^4$ 個のT細胞ラインを、0.2mlの15%血清を含むRPMI-1640培養液中で2日間培養し、 $0.5 \mu\text{Ci}$ の $[^3\text{H}]$ チミジンを添加後さらに18時間培養した。細胞を細胞ハーベスターでガラスフィルターに捕集した後、液体シンチレーションカウンターで $[^3\text{H}]$ チミジンの細胞内取り込み量を測定した。ペプチドを添加した際の $[^3\text{H}]$ チミジンの細胞内取り込みの値を、ペプチドを添加しない対照 $[^3\text{H}]$ チミジンの細胞内取り込み量の値で割ることによって得られる値（刺激係数/Stimulation Index）が2以上である場合を、添加したペプチドが抗原ペプチドとして認識されたと定義する。

#### 【0037】

Cry j 1の場合、各患者が認識するCry j 1分子上のT細胞エピトープ部位は、平均9.8でありその範囲は $4 \leq \text{エピトープ数} \leq 15$ であった。他方、Cry j 2の場合は平均8.7であり、その範囲は $2 \leq \text{エピトープ数} \leq 13$ であった。Cry j 1は、353アミノ酸、Cry j 2は379アミノ酸で構成されるため、100アミノ酸残基あたりおよそ2.3～2.8箇所のT細胞エピトープ部位が存在することになる。

#### 【0038】

HLA-クラスIIタイプは、患者ごとに異なると考えられるため、認識されるT細胞エピトープは、HLA-クラスIIタイプごとに異なると予測される。そのため、各患者が認識する抗原ペプチドを患者ごとにマップした。その結果、Cry j 1、Cry j 2分子上では、各患者で認識され得るエピトープ部位は異なっていた。アレルゲン分子上では、個人によってT細胞エピトープとして認識され易い部位と認識されにくい部位が存在する。また、T細胞エピトープごとにT細胞の増殖率が異なるため、このエピトープマップのみでは、多重エピトープのデザインにどの抗原ペプチドを選定してよいのかの判定ができない。そこで、18名の患者について、刺激係数が2以上である場合の抗原ペプチドについて平均の刺激係数を算出し、この値に当該抗原ペプチドを保持する患者の割合（出現頻度）をかけることによって、エピトープごとの優位性を示す「重要度指数」を算出した（国際公開第94/01560号

10

20

30

40

50

参照)。

#### 【0039】

図1と図2にその結果を示す。Cry j 1においては、ペプチド番号43番 (p211-225) が重要度指数が679で最高値を示し、ペプチド番号22番の指数は578、ペプチド番号4番の指数は373と続いている。Cry j 2においては、ペプチド番号14番の指数が709で最高値を示し、ペプチド番号38番の指数が680、ペプチド番号48の指数が370と続いている。ペプチド免疫療法を考慮した場合には、重要度指数の高い抗原ペプチド一つを選定しペプチド免疫療法として使用する方法があるが、出現頻度の最も高いペプチドであるCry j 1のNo.22、あるいはNo.43の場合でも72%の患者でしか効果が期待できず、実際の有効率はさらに下がるであろう。有効率を上げるためにはいくつかのT細胞エピトープを組み合わせる必要がある。この場合、T細胞エピトープの選定には、重要度指数の高いものが候補となるが、いくら重要度指数の高いエピトープのみを選択しても、これらのエピトープを抗原として提示するHLAクラスII分子が同一であれば有効率を上げることはできない。そのため、T細胞エピトープペプチドを提示するHLAクラスII分子のタイプを同定する必要がある。

#### 【実施例2】

#### 【0040】

T細胞クローンの認識するT細胞エピトープペプチドの同定

18名のスギ花粉症患者の中でCry j 1において高い重要度指数を示すペプチド番号43番と22番を認識する患者2名〔患者B (以下PBと略す)、患者J (PJ)〕とCry j 2において高い重要度指数を示すペプチド番号14番、38番、48番、69番を認識する患者3名〔PB、患者C (PC)、患者R (PR)〕を選定しこれらのスギ花粉症患者の末梢血リンパ球をCry j 1またはCry j 2で刺激してCry j 1またはCry j 2を認識するT細胞クローンを樹立した。4名の患者のHLA-クラスIとクラスIIタイプを以下に示す。

PB: A2/24 - B39/55 - Cw7/w3 - DRB1\*1501/0901 - DRB4\*0101 - DRB5\*0101、DQA1\*0102/0301 - DQB1\*0602/0303 - DPA1\*0101/0101 - DPB1\*0501/0201、

PJ: A24/- - B61/51 - Cw3/- - DRB1\*1501/0802 - DRB5\*0101、DQA1\*0102/0401 - DQB1\*0602/0402 - DPA1\*-/- - DPB1\*0501/0402、

PC: A-2/2 - B54/51 - Cw1/-、DRB1\*0405/1501 - DRB4\*0101 - DRB5\*0101 - DQA1\*0301/0102 - DQB1\*0401/0602 - DPA1\*0202/0202 - DPB1\*0201/0501、

PR: A-11/- - B60/35 - Cw7/w3 - DRB1\*0901/1501 - DRB4\*0101 - DRB5\*0101 - DQA1\*0301/0102 - DQB1\*0303/0602 - DPA1\*01/0202 - DPB1\*0201/0201)。

#### 【0041】

Cry j 1を特異的に認識するT細胞クローンを、PB由来末梢血リンパ球から計35種類、PJ由来末梢血リンパ球から計14種類樹立した。同様に、Cry j 2を特異的に認識するT細胞クローンを、PB由来末梢血リンパ球から計31種類、PC由来末梢血リンパ球から10種類、PR由来末梢血リンパ球から17種類樹立した。これらのT細胞クローンは全てCD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>-</sup>、TCR $\alpha$  $\beta$ <sup>+</sup>、TCR $\gamma$  $\delta$ <sup>-</sup>であるため、拘束分子はHLA-クラスII分子であることが判明した。96-ウェルマイクロ培養プレート上でマイトマイシンC処理した5 $\times$ 10<sup>4</sup>個の自己由来B細胞株、2 $\mu$ Mのオーバーラッピングペプチド及び2 $\times$ 10<sup>4</sup>個のT細胞クローンを0.2mlの15%血清を含むRPMI-1640培養液中で2日間培養し、0.5 $\mu$ Ciの[<sup>3</sup>H]チミジンを添加後さらに18時間培養した。細胞を細胞ハーベスターでガラスフィルターに補集した後、液体シンチレーションカウンターで[<sup>3</sup>H]チミジンの細胞内取り込みを測定した。この操作で、各T細胞クローンの認識するT細胞エピトープを同定した。

#### 【0042】

作製したCry j 1を認識するT細胞クローンの中で69% (34/49) は抗原を含むペプチド刺激に対して増殖応答を示し、抗原ペプチドを同定できた。同様に、Cry j 2を認識するT細胞クローンの中で、69% (40/58) において抗原ペプチドを同定できた。Cry j 1を特異的に認識するT細胞クローンは、ペプチド番号4、13、19、22、30、31、39、43、51、66番、Cry j 2を特異的に認識するT細胞クローンは、ペプチド番号4、8、14、17、31、37、38、48、65、66、68、69、70番を認識していた。結果を図3と図4にまとめた。

## 【実施例 3】

## 【0043】

遺伝子座レベルにおけるHLAクラスII拘束分子の同定

実施例 2 で樹立したT細胞クローンの増殖応答系に、HLA-クラスIIの DR、DQ、またはDP に対して特異的に反応する単クローン抗体を添加して、T細胞の増殖応答を阻止することにより、遺伝子座レベルでのHLAクラスII拘束分子を同定した。

## 【0044】

96-ウエルミクロ培養プレート上で、マイトマイシンC処理した $2 \times 10^4$  個の自己由来B細胞株、 $2 \mu\text{M}$ のオーバーラッピングペプチド、 $3 \mu\text{g/ml}$ の抗 DR、DQ、またはDP単クローン抗体（ベクトン/ディッキンソン社製）、 $2 \times 10^4$  個のT細胞クローンを、0.2 mlの15%血清を含むRPMI-1640 培養液中で2日間培養し、 $0.5 \mu\text{Ci}$ の $[^3\text{H}]$ チミジンを添加後さらに18時間培養した。細胞を細胞ハーベスターでガラスフィルターに補集した後、液体シンチレーションカウンターで $[^3\text{H}]$ チミジンの細胞内取り込みを測定した。結果を図5に示す。この図から、Cry j 1 p106-120、Cry j 2 p66-80、Cry j 2 p186-200ペプチドの拘束分子はDR、Cry j 2 p341-355 ペプチドの拘束分子はDQ、Cry j 1 p211-225、Cry j 2 p181-195 の拘束分子はDPであることがわかる。他のT細胞クローンの拘束分子についても同様に解析した（図3及び図4参照）。

## 【実施例 4】

## 【0045】

HLAクラスII分子の個々のタイプにおける拘束分子の同定

HLAクラスII遺伝子座レベルでの拘束分子が同定できたT細胞クローンを、DRに関しては、個々のタイプを遺伝子導入したマウスL-細胞、DQまたはDPに関しては、タイプに関してハプロタイプの一一致するB細胞株を抗原提示細胞として用いることにより個々のタイプにおける拘束分子の同定が可能である。

## 【0046】

96-ウエルミクロ培養プレート上でマイトマイシンC処理した $5 \times 10^4$  個のマウスL-細胞、またはハプロタイプの一一致するB細胞株、 $2 \mu\text{M}$ のオーバーラッピングペプチド、 $3 \mu\text{g/ml}$ の抗DR、DQ、またはDP単クローン抗体（ベクトン/ディッキンソン社製）、 $2 \times 10^4$  個のT細胞クローンを0.2 mlの15%血清を含むRPMI-1640培養液中で2日間培養し、 $0.5 \mu\text{Ci}$ の $[^3\text{H}]$ チミジンを添加後さらに18時間培養した。細胞を細胞ハーベスターでガラスフィルターに補集した後、液体シンチレーションカウンターで $[^3\text{H}]$ チミジンの細胞内取り込みを測定した。

## 【0047】

T細胞クローンの増殖応答が観察された場合に、拘束分子が同定できる。Cry j 1 p106-120ペプチドを提示する拘束分子はDRB5\*0101、Cry j 1 p211-225ペプチドを提示する拘束分子はDPA1\*0101 - DPB1\*0501、Cry j 2 p66-80ペプチドを提示する拘束分子は DRB5\*0101、Cry j 2 p181-195ペプチドを提示する拘束分子はDPA1\*0101 - PDB1\*0201、Cry j 2 p186-200ペプチドを提示する拘束分子はDRB4\*0101、Cry j 2 p341-355ペプチドを提示する拘束分子はDQA1\*0102 - DQB1\*0602であった（図6）。他のエピトープ部位についての解析結果は図3及び図4に記載されている。

## 【実施例 5】

## 【0048】

T細胞クローンのThタイプの同定

アレルギーの発症にはTh2細胞の関与が想定されている。現在の研究レベルでは、抗原刺激後、T細胞のTh1またはTh2細胞への分化が、特定のエピトープペプチドまたはHLA-クラスII遺伝子座レベルで規定されているのかはまだ、未解決な部分が多い。しかし、ペプチドで刺激後、Th2細胞が優位に誘導される場合には、ペプチド投与によりスギ花粉症が悪化する可能性が高い。実施例 2 で作製したT細胞クローンをT細胞が認識するエピトープペプチドで刺激し、IL-2、IL-4、IFN $\gamma$  の産生量を測定することによってThタイプを決定した。

## 【0049】

24-ウェルマイクロ培養プレート上でマイトマイシンC処理した $1 \times 10^5$ 個の自己由来B細胞株、 $2 \mu\text{M}$ のエピトープペプチド、 $5 \times 10^5$ 個のT細胞クローンを1mlの10%ヒト血清を含むRPMI-1640培養液中で24時間培養した。遠心で細胞を沈澱させ、培養上清を得た。培養上清中のIL-2、IL-4、IFN $\gamma$ は市販のELISAキット [IL-2(R&D社製)]、IL-4(メドジェニックス社製)、IFN $\gamma$ (大塚アッセイ研究所製)で測定した。

## 【0050】

各T細胞クローンの産生するIL-2、IL-4、IFN $\gamma$ 量を図3、図4に示す。Cry j 1を認識するT細胞クローンは、Th2細胞が12、Th1細胞が1、Th0細胞が16であり、Th2がTh1よりも多かったが、Cry j 2を認識するT細胞クローンはTh2細胞が10、Th1細胞が8、Th0細胞が8であり、Th2とTh1とは同程度であった。個々のT細胞クローンの認識するT細胞エピトープ、拘束分子、Thタイプを比較すると、個々のT細胞クローンによってTh2、Th1、Th0タイプは異なり、同一のエピトープ、同一の抗原提示分子を認識する数個のT細胞クローンには、Th2細胞とTh1細胞が見いだされている。これらの結果は、Cry j 1またはCry j 2刺激後のT細胞のTh2、Th1、またはTh0細胞への分化は、特定のT細胞エピトープ、特定の拘束分子の組み合わせでは規定されていないことを意味している。つまり、T細胞エピトープ部位を含むペプチドは全て、本発明の多重エピトープペプチドの候補となりうるということが判明した。

## 【実施例6】

## 【0051】

## 多重エピトープペプチドの作製

Cry j 1及びCry j 2分子中に存在するIgE抗体エピトープ部位を同定した結果、Cry j 1にはこの一次構造を認識するIgEエピトープは存在しないこと、Cry j 2にはIgE抗体エピトープが少なくとも4ヶ所存在することが明らかとなったが、これらのIgE抗体エピトープ部位は、T細胞エピトープ部位とは異なる部位であった。この知見をもとに、Cry j 1及びCry j 2のT細胞エピトープ部位のうち、図7に示すペプチドを選択した。

## 【0052】

図7のペプチドa、bはそれぞれ図1のCry j 1のペプチドNo. 43、22に対応し、ペプチドcは図2のCry j 2のNo. 14に対応し、d、eはそれぞれ図2のCry j 2の37-38及び69-71のアミノ酸の一部からなるものである。

## 【0053】

これらの5種類のペプチドを直列につなぎ合わせて多重エピトープペプチドを作製する場合、2つのペプチドとaとbはa-bの順で固定し残りの3つのペプチド(c、d及びe)をランダムにつなぎ合わせ且つ各ペプチドの間にArg-Argの配列を挿入した多重エピトープペプチドは下記の6種類となる。

C.A.#1. a-Arg-Arg-b-Arg-Arg-c-Arg-Arg-d-Arg-Arg-e

C.A.#2. a-Arg-Arg-b-Arg-Arg-c-Arg-Arg-e-Arg-Arg-d

C.A.#3. a-Arg-Arg-b-Arg-Arg-d-Arg-Arg-c-Arg-Arg-e

C.A.#4. a-Arg-Arg-b-Arg-Arg-d-Arg-Arg-e-Arg-Arg-c

C.A.#5. a-Arg-Arg-b-Arg-Arg-e-Arg-Arg-c-Arg-Arg-d

C.A.#6. a-Arg-Arg-b-Arg-Arg-e-Arg-Arg-d-Arg-Arg-c

## 【実施例7】

## 【0054】

## 多重エピトープペプチドのヒトIgE抗体に対する反応性

実施例6で得た6種の多重エピトープペプチド(C.A.#1～#6)を0.2M酢酸緩衝液(pH4.5)に溶解させ、0.1ml/ウェルでブラックプレート(大日本製薬社製)に加えて4℃で一晩放置した。抗原溶液を除去した後、洗浄液で3回洗浄し、29名のスギ花粉患者及び健康人血清(4倍希釈)を加えて、37℃で4時間反応させた。血清を除去後、洗浄液で3回洗浄し、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ標識抗ヒトIgE抗体(Pharmacia社製)を室温で一晩反応させた。洗浄液で3回洗浄後、0.1mM 4-メチルウンベリフェリル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド/0

10

20

30

40

50

.01M リン酸緩衝液 (pH 7.0)、0.1M NaCl、1mM MgCl<sub>2</sub>、0.1% NaN<sub>3</sub>、0.1% BSAの基質溶液を加え、37℃で2時間反応させた。0.1M グリシン/NaOH、pH10.3溶液をこれに加えて反応を停止させ、蛍光分光光度計(Labsystems)で蛍光強度を測定した。なお、各多重エピトープペプチドに対する陽性コントロールとしてビオチン標識ウサギ抗dエピトープIgGとガラクトシダーゼ標識ストレプトアビジン(ピアス社製)を反応させた。

#### 【0055】

この結果、29名全てのヒト血清は、6種の多重エピトープペプチド(C.A.#1～#6)全てについて蛍光強度が3～5であった(ブランク値は3又は4)。これに対してスギ花粉から抽出、精製した抗原であるCry j 1には、蛍光強度1,000以上が6名、100以上が14名、10以上が4名、9以下が5名であった。一方、ウサギ抗dエピトープペプチドIgGは6種のコンセンサスアレルゲンに対して3,000以上を示した(ブランク値は112、Cry j 1アレルゲンには230)。以上のことから、多重エピトープペプチドはスギ花粉症患者のアレルゲン特異的IgE抗体と実質的に結合せず、また、各エピトープの接続順序はヒトIgE抗体との反応性に影響を与えないことが判明した(図8)。

#### 【実施例8】

#### 【0056】

多重エピトープペプチドのT細胞エピトープの認識の有無

実施例6で得た多重エピトープペプチドのうちC.A.#4を構成する抗原ペプチドが実際にT細胞エピトープとして機能しているかどうかについて検討した。

#### 【0057】

96-ウエルマイクロ培養プレート上でマイトマイシンC処理した $5 \times 10^4$ 個の自己由来B細胞株、 $2 \times 10^4$ 個のT細胞クローンを、0.2mlの15%血清を含むRPMI-1640培養液中で、抗原として50μg/mlのCry j 1、2μg/mlのCry j 2、多重エピトープペプチドC.A.#4を構成する個々の抗原ペプチド、または遺伝子発現で作製した10μg/mlのC.A.#4多重エピトープペプチドのいずれかと共に2日間培養し、0.5μCiの[<sup>3</sup>H]チミジンを添加後さらに16時間培養した。細胞を細胞ハーベスターでガラスフィルターに補集した後、液体シンチレーションカウンターで[<sup>3</sup>H]チミジンの細胞内取り込みを測定した。結果を図9に示す。

#### 【0058】

Cry j 1 p106-120を認識するT細胞クローンPB8-3、Cry j 1 p211-225を認識するT細胞クローンPB8-34、Cry j 2 p66-80を認識するT細胞クローンPB4-22、Cry j 2 p181-195を認識するT細胞クローンPB14-5、Cry j 2 p186-200を認識するT細胞クローンPB14-34はいずれも抗原ペプチドによく反応している。一方、多重エピトープペプチドの場合も、個々のペプチドと同様の強さでT細胞クローンが増殖応答している。Cry j 2 p341-355を認識するT細胞クローンPB14-19に関しては、多重エピトープペプチド刺激に対してやや弱い増殖応答が観察された。

#### 【0059】

以上の結果は多重エピトープペプチドに含まれる抗原ペプチドは各々エピトープとしてよく機能し、T細胞を活性化する能力を保持していることを示している。

#### 【実施例9】

#### 【0060】

多重エピトープペプチドによるスギ花粉症患者末梢血リンパ球の増殖応答

多重エピトープペプチドはT細胞エピトープ部位を含むため、ペプチド免疫療法を試みる場合には、末梢血リンパ球に増殖応答を惹起させることが必要である。多重エピトープペプチドで末梢血リンパ球を刺激し、増殖応答が観察されるかについて調査した。

#### 【0061】

スギ花粉症患者または健常人由来末梢血リンパ球を10%ヒト血清を含むRPMI-1640培養液に懸濁した後、96-ウエル丸底培養プレートの各ウエルに $2.5 \times 10^5$ 個/200μlになるように播種した。配列番号:1の多重エピトープペプチド、Cry j 1またはCry j 2のいずれかを、多重エピトープペプチドが最終濃度0.001～20μg/ml、Cry j 1が50μg/ml、Cry j 2が2μg/mlになるように添加し、6日間培養した。0.5μCiの[<sup>3</sup>H]チミジンを添加してさ

らに16時間培養した。細胞を細胞ハーベスターでガラスフィルターに補集した後、液体シンチレーションカウンターで $[^3\text{H}]$ チミジンの細胞内取り込みを測定した。

#### 【0062】

患者6名の中で5名の末梢血リンパ球が多重エピトープペプチドに対して増殖応答を示した。患者1名と健常者2名の末梢血リンパ球は増殖応答を示さなかった（図10）。

#### 【0063】

末梢血リンパ球の増殖応答は $0.1\mu\text{g/ml}$ の多重エピトープペプチド刺激で起こり始め、投与量に比例して増殖応答は増大した。この結果から、*in vitro*で十分なT細胞増殖応答を誘導する多重エピトープペプチドの濃度は $10\mu\text{g/ml}$ 以上であると判断された。

#### 【0064】

17名のスギ花粉症患者と2名の健常者由来末梢血リンパ球を $10\mu\text{g/ml}$ の配列番号：1の多重エピトープペプチドで刺激し、T細胞応答を算定した。健常人の末梢血リンパ球ではT細胞増殖応答能が観察されなかった。17名の患者では最高で9,652cpmの $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みが観察された。抗原刺激なしの末梢血リンパ球の $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みを1と計算し、抗原存在下の末梢血リンパ球の $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込み値を刺激係数（SI）で表現し、結果を図11に示した。T細胞エピトープの同定の際には $\text{SI} > 2$ 以上を陽性とみなすため、同様に $\text{SI} > 2$ 以上をペプチドに対して増殖応答が観察されたとみなすことにすると、17名の患者の中で13名（76.5%）に増殖応答がみられた。この結果から、スギ花粉症患者にペプチドを投与した場合には76.5%の患者においてペプチド免疫療法の効果があると判定される。

#### 【0065】

スギ花粉症患者に、本発明の多重エピトープペプチドでペプチド免疫療法を試みる場合、前もって、患者由来末梢血リンパ球の多重エピトープペプチドに対する増殖応答能を調査し、増殖応答の見られる患者を選定することができる。この試験によって多重エピトープペプチドを用いたペプチド免疫療法がその患者に適用できるのかが判定できるし、増殖応答能の高さから治療効果についてもある程度の予測ができると考えられる。

#### 【実施例10】

#### 【0066】

マウスを用いたスギ花粉アレルゲン投与による免疫寛容の誘導

スギアレルゲンを投与して治療を行なう、いわゆる減感作治療のメカニズムについて、詳細はわかっていない。そこでマウスを用いた動物実験を行なった。スギ花粉アレルゲン、Cry j 1 を1匹当たり $300\mu\text{g}$ 、CB6F1マウス（雌、5匹）の皮下に5日間隔で2回投与した。コントロールとして同容量のPBSを皮下投与（雌、5匹）した。さらに5日後にCry j 1  $100\mu\text{g}$ をAlum アジュバンドと共に皮下に投与して免疫を行ない、さらに10日後にリンパ節細胞を単離し、コントロール群マウスのリンパ節細胞、Cry j 1 投与マウスのリンパ節細胞をそれぞれの群単位でプールした。プールしたリンパ球にCry j 1 を0, 50, 150  $\mu\text{g/ml}$  加え、さらに3日間培養を行ない、培養上清を採取して含まれるIL-2を測定した（Endogen 社製）。その結果を図12に示す。コントロール群であるPBS投与マウスはCry j 1 濃度が0, 50, 150  $\mu\text{g/ml}$  と増加すると共にIL-2の産生量が増加した。一方、Cry j 1 投与マウスはこれらのコントロールマウスに比べ明かにIL-2の産生量が減少し、スギ花粉アレルゲン投与によって免疫寛容が生じた。この結果は現在用いられているスギ花粉アレルゲンによる減感作療法の有効例を再現している。

#### 【実施例11】

#### 【0067】

CB6F1マウスのT細胞エピトープの同定

8週齢の雄CB6F1マウスをアジュバンド（Imject Alum: ピアス社製）と共に組み換えCry j 2（rCry j 2） $10\mu\text{g}$ で2週間おきに3回免疫した（ip）。最終免疫から1週間後にマウス3匹から脾細胞を調製し一つにまとめた。96ウエルプレート（ファルコン社製）1ウエルに対し脾細胞（ $5 \times 10^6$ ）を15残基からなる74種類のCry j 2のオーバーラッピングペプチド（ $0.115\mu\text{M}$ ）のそれぞれと共に0.2mlのRPMI培地（10% FCS、2mM L-グルタミン、50U/ml

10

20

30

40

50

ペニシリン、50  $\mu$ g/ml ストレプトマイシン) で培養した。対照としてPBS、50  $\mu$ g/ml Cry j 1、0.3  $\mu$ g/ml rCry j 2のそれぞれに対する反応も検討した。各々の試験試薬に対し3 ウェル播種し、37℃、5% CO<sub>2</sub>条件下で3日間培養した。最後の6時間0.5  $\mu$ Ci/ウェルの [<sup>3</sup>H]-チミジンでパルスラベルを行いセルハーベスター (Inotech、ベルトールドジャパン社製) で細胞をガラスフィルター上に捕集し、乾燥した後、液体シンチレーションカウンタ (TRI-CARB 4530、パッカーダジャパン社製) で [<sup>3</sup>H]-チミジンの細胞内取り込みを測定した。

#### 【0068】

rCry j 2で免疫したCB6F1マウスは抗原であるrCry j 2に強い反応性を示したが、もう一つのスギ花粉主要アレルゲンであるCry j 1には反応せず、この系が抗原特異的反応であることが確認された。そして、rCry j 2で免疫したCB6F1マウスは、調べた74種類のオーバーラッピングペプチドのうち図2に示すNo. 14ペプチドとNo. 48ペプチドに顕著な応答性を示した。このことからCB6F1マウスにおいてNo. 14とNo. 48のペプチドが主要T細胞エピトープとして抗原提示に関与していることが示された。ヒトにあってもNo. 14とNo. 48のペプチドは主要T細胞エピトープペプチドであることから、CB6F1マウスはスギ花粉に対するペプチド免疫療法に使用するペプチドの有効性を評価するうえで有用なモデル動物になると判断された。

#### 【実施例12】

#### 【0069】

抗原ペプチドNo. 14のインビボにおける免疫応答

1群8匹の雄CB6F1(8週令、雄)マウス1匹当たり生理食塩水に溶解した3mg No. 14ペプチドを、5日間隔で2回皮下投与した。対照群としては等容量(200  $\mu$ l)の生理食塩水を同様に投与した。2回目のペプチド投与後5日目にインジェクトアルム(Imject Alum)と混合したrCry j 2(50  $\mu$ g/匹)で全てのマウスを皮下免疫した。免疫1週間後に各々のマウスから脾細胞を調製した。96ウェルプレート(ファルコン)1ウェルに対し脾細胞( $5 \times 10^6$ )をrCry j 2(3  $\mu$ g/ml)と共に0.2mlのRPMI培地(10% FCS、2mM L-グルタミン、50U/ml ペニシリン、50  $\mu$ g/ml ストレプトマイシン)で培養した。対照としてrCry j 2を含まない条件下で培養した。<sup>3</sup>H-チミジンによるT細胞増殖の測定は、実施例1に記載された方法に準じて行った。サイトカイン測定は、対照を含めた3種類のペプチド投与群(0.3, 1, 3, 10  $\mu$ g/ml)について、in vitroで0.3  $\mu$ g/mlのCry j 2で刺激したときの培養上清を用いた。

#### 【0070】

CB6F1マウスに予めNo. 14ペプチドを皮下投与しておくで続くrCry j 2による抗原刺激に対し、T細胞の免疫応答性が生理食塩水投与群に比べ有意( $p < 0.01$ )に抑制された(図13)。IL-2産生に関しては、3種類のペプチド投与群においてそれぞれ対照群より有意に減少した。このことからマウスのモデル系においてNo. 14ペプチドはスギ花粉アレルギーに対しペプチド免疫療法の予防効果を有することが示された。

#### 【実施例13】

#### 【0071】

抗原ペプチドNo. 48のインビボにおける免疫応答

6週齢の雄CB6F1マウス1匹当たり生理食塩水に溶解した3mg No. 48ペプチドを、5日間隔で2回皮下投与した。対照群としては等容量(200  $\mu$ l)の生理食塩水を同様に投与した。ペプチド投与群及び対照群の動物数は各々8匹とし、2回目のペプチド投与から5日目にアジュバント(Imject Alum)と混合したrCry j 2(50  $\mu$ g)で全てのマウスを皮下免疫した。免疫1週間後に各々のマウスから脾細胞を調製した。96ウェルプレート(ファルコン)1ウェルに対し脾細胞( $5 \times 10^6$ )をrCry j 2(3  $\mu$ g/ml)と共に0.2mlのRPMI培地(10% FCS、2mM L-グルタミン、50U/mlペニシリン、50  $\mu$ g/mlストレプトマイシン)で培養した。対照としてrCry j 2を含まない条件下で培養した。<sup>3</sup>H-チミジンによるT細胞増殖の測定は実施例10に記載された方法に準じて行った。

#### 【0072】

CB6F1マウスに予めNo.48ペプチドを皮下投与しておくとし、続くrCry j 2による抗原刺激に対し、T細胞の免疫応答性が生理食塩水投与群に比べ有意に抑制された( $p<0.05$ )。このことからマウスのモデル系においてNo.48ペプチドはスギ花粉アレルギーに対しペプチド免疫療法による予防効果を有することが示された(図14)。

#### 【0073】

以上の実験結果から、従来行われてきたヒトにおけるスギ花粉抽出エキスによる減感作療法がT細胞エピトープを介した作用機作であることが明らかになった。

#### 【実施例14】

#### 【0074】

##### コア配列の決定

Cry j 1 ペプチド番号22番(p106-120)のT細胞ラインおよびT細胞クローン増殖応答に必要なアミノ酸配列(core)を決定するために、図15に示すようにこのペプチドのN末端およびC末端から1残基づつのアミノ酸を削除してp107-120(p22-2), p108-120(p22-3), p109-120(p22-4), p110-120(p22-5), p111-120(p22-6), p106-119(p22-7), p106-118(p22-8), p106-117(p22-9), p106-116(p22-10), p106-115(p22-11)の11種類のペプチドをペプチド合成機(PSSM-8, 島津製作所製)により合成した。Cry j 1ペプチド番号22番のp106-120と反応する3名のスギ花粉症患者のT細胞ライン(PJ, PR, PB)、および患者1名のT細胞クローン(PB 8-3, PB 8-2, PB 9-39)を実施例1及び2の方法を用いてこれら11種類のペプチドに対する反応性を検討した。2種類のT細胞ライン(PJ, PB)と2種類のT細胞クローン(PB 8-2, PB 9-39)はp106-120(p22-1)を認識して増殖したが、1種類のT細胞ラインとT細胞クローンは増殖応答を示さなかった(図15)。この結果、p106-120コア配列は「FIKRVSNVI」(配列番号: 4)の9残基であることが判明した(この9残基をCry j 1 #22 core と表示する)。

#### 【実施例15】

#### 【0075】

スギ花粉およびヒノキ花粉アレルゲン由来T細胞エピトープを含む多重エピトープペプチド

ヒノキ花粉アレルゲンCha o 1 のT細胞エピトープ(特願平8-153527号)であるペプチド番号8(p71-90; IFSKNLNILNMPYIAGNK),あるいはペプチド番号32(P311-330; SSGKNEGTNIYNNNEAFKVE)と実施例14で得られたCry j 1 #22 コア配列「FIKRVSNVI」をつないだペプチド2種類(Cha o 1 #8-Cry j 1 #22 core, Cha o 1 #32-Cry j 1 #22 core)をペプチド合成機(PSSM-8; 島津製作所製)で合成した。Cha o 1 #8とCry j 1 #22 core, Cha o 1 #32とCry j 1 #22 coreとの間には RR 配列を挿入した。即ち Cha o 1 #8-Cry j 1 #22 core(配列番号: 5)と Cha o 1 #32-Cry j 1 #22 core(配列番号: 6)である。

#### 【0076】

スギ花粉症患者およびヒノキ花粉症患者からそれぞれCry j 1特異的T細胞ラインおよびCha o 1特異的T細胞ラインをそれぞれ作製した。Cry j 1 特異的T細胞ラインおよびCha o 1特異的T細胞ラインは、結核菌抗原(PPD)および溶連菌細胞壁(SCW)抗原とは反応せず、またCry j 1 特異的T細胞ラインはCry j 1 #22あるいはCry j 1 #22 core とは反応するが、Cha o 1 #8 及び#32とは反応せず、Cha o 1 特異的T細胞ラインはCha o 1 #8及び#32とは反応するが Cry j 1 #22あるいはCry j 1 #22coreとは反応しなかった(図16)。一方これらのT細胞ラインはいずれも、配列番号: 5の多重エピトープペプチド及び配列番号: 6の多重エピトープペプチドの両方に反応した。これらの結果から、スギ花粉およびヒノキ花粉アレルゲン由来のT細胞エピトープをつないだ多重エピトープペプチドは、スギ花粉症患者およびヒノキ花粉症患者のペプチド免疫療法に有効であることが明らかとなった。

#### 【実施例16】

#### 【0077】

##### アナログペプチドの増殖応答およびサイトカイン産生

Cry j 1 #22 coreのT細胞エピトープペプチドのアミノ酸を置換することによってT細胞

10

20

30

40

50



胞の活性を調節することが可能か否かを、2つのクローンPJ7-9及びPB10-18を用いて検討した。Cry j 1ペプチド番号22番p106-120に反応するT細胞クローンPJ7-9及びPB10-12は、DRB5\*0101を拘束分子とし、Cry j 1#22coreの9残基を認識する。この9残基を含む13残基のペプチドp108-120 (VFIKRVSNNVIHG) 中の9残基の各アミノ酸を、類似アミノ酸、非類似アミノ酸の2種類のアミノ酸によって置換したアナログペプチドを合成した (図17、18)。そして、これらのアナログペプチドに対するT細胞クローンPJ7-9及びPB10-18の反応性を [ $^3$ H] チミジンの取込み量で調べた。反応溶液中のサイトカイン濃度は、R&D Systems 社製のサイトカイン測定キットで測定した。その結果を、図17及び図18に示した。ここで、アミノ酸置換していない13残基のペプチドを反応させた上清の IFN  $\gamma$ 、IL-4、IL-2、IL-5の産生量及び細胞の [ $^3$ H] チミジンの取込み量をそれぞれ100%とした。PJ7-9クローンの場合、Cry j 1#22core「FIKRVSNNVI」の3、4、6番目の各アミノ酸部分「K」「R」「S」は類似アミノ酸置換と非類似アミノ酸置換の両者、あるいは非類似アミノ酸置換により [ $^3$ H] チミジンの取り込みおよびサイトカインの産生量がそれぞれ著しく抑制された (図17)。従って、これらの部分のアミノ酸はペプチドを介したHLA分子とT細胞レセプター分子の複合体形成に重要な部分と考えられる。1番目のアミノ酸 (F) を類似アミノ酸である Y に置換しても [ $^3$ H] チミジンの取り込み量とIL-4、IL-5の産生量に変化は認められないが、非類似アミノ酸である「S」に置換すると [ $^3$ H] チミジンの取り込み量に変化は認められないにもかかわらず、IFN  $\gamma$  と IL-2の産生量は著しく増大した。PB10-18クローンの場合は、Cry j 1#22coreの1、2、3、4、6、7、8番目のアミノ酸置換によって [ $^3$ H] チミジンの取り込みが抑制され、これらの部分のアミノ酸はペプチドを介したHLA分子とT細胞レセプター分子の複合体形成に重要な部分と考えられる。さらに6、7、8番目のアミノ酸置換によってIL-5の産生量に比較して IL-2の産生抑制が認められた (図18)。これらの結果から、Cry j 1#22coreの1番目のアミノ酸FをSに置換した「SIKRVSNNVI」が IFN- $\gamma$ の産生量を増大させたことにより、アレルギーの治療剤として有用であることが明らかとなった。

【産業上の利用可能性】

【0078】

本発明の多重エピトープペプチドは、異なるアレルギー分子由来のT細胞エピトープペプチドを含み、かつ、アレルギー患者集団の中で遺伝子頻度の高いHLAクラスII分子で提示されるペプチドを含み、さらには、HLAクラスII遺伝子座 (DR、DQ、DP) 間で異なる分子で提示されるペプチドを数個含むので、最小の多重エピトープペプチドの長さで、有効対象患者数を拡大したペプチド免疫療法が期待できる。

【0079】

また、アレルギー患者に、本発明の多重エピトープペプチドを用いてペプチド免疫療法を試みる場合、前もって、患者由来の末梢血リンパ球の該ペプチドに対する増殖応答能を調査し、増殖応答が惹起される患者を選定することができる。この調査によって、多重エピトープペプチドによるペプチド免疫療法がその患者に適用できるかどうかの判定が可能であり、増殖応答能の高さから、治療効果についてもある程度予測が可能である。

【図面の簡単な説明】

【0080】

【図1】図1は、スギ花粉症患者由来の細胞ラインのCry j 1オーバーラップペプチドに対する、平均刺激係数、出現頻度及び重要度指数 (平均刺激係数 $\times$ 出現頻度) を示す図である。

【図2】図2は、スギ花粉症患者由来の細胞ラインのCry j 2オーバーラップペプチドに対する、平均刺激係数、出現頻度及び重要度指数 (平均刺激係数 $\times$ 出現頻度) を示す図である。

【図3】図3は、Cry j 1の抗原ペプチドを拘束するHLAクラスIIタイプ及び当該抗原ペプチドとHLAクラスII拘束分子の複合体を認識するT細胞クローンのThタイプを示す図である。

【図4】図4は、Cry j 2の抗原ペプチドを拘束するHLAクラスIIタイプ及び当該抗原ペ

プチドとHLAクラスII分子の複合体を認識するT細胞クローンのThタイプを示す図である。

【図5】図5は、抗原ペプチドと結合するHLAクラスII分子の遺伝子座レベル(DR、DQ、DP)における同定結果を示す図である。

【図6】図6は、抗原ペプチドと結合するHLAクラスII分子の各遺伝子座の対立遺伝子レベルにおける同定結果を示す図である。

【図7】図7は、多重エピトープペプチドに用いた抗原ペプチド結合配列を示す図である。図中a及びbはCry j 1のNo.43及び22のペプチドに対応し、cはCry j 2のNo.14に対応し、d、eは、No.37-38 (p181-200)、No.69-71 (p346-365)に対応する。

【図8】図8は、多重エピトープペプチド、C.A.#1、C.A.#2、C.A.#3、C.A.#4、C.A.#5、C.A.#6のヒトIgEとの反応性を示す図である。 10

【図9】図9は、T細胞クローンによる多重エピトープペプチド、C.A.#4に含まれるT細胞エピトープの認識結果を示す図である。

【図10】図10は、スギ花粉症患者と健常者の末梢血リンパ球に対する各種濃度の多重エピトープペプチド(配列番号:1)刺激によるリンパ球増殖応答能を示す図である。

【図11】図11は、2名の健常者と17名のスギ花粉症患者の末梢血リンパ球に対する配列番号:1の多重エピトープペプチド刺激による増殖応答能を示す図である。

【図12】図12は、CB6F1マウスに対するスギ花粉アレルゲンCry j 1投与による免疫寛容の誘導を示す図である。

【図13】図13は、CB6F1マウスに対するCry j 2のNo.14ペプチド(p66-80)投与による免疫寛容を示す図である。 20

【図14】図14は、CB6F1マウスに対するCry j 2のNo.48ペプチド(p236-250)投与による免疫寛容を示す図である。

【図15】図15は、Cry j 1のNo.22ペプチド(p106-120)のコアアミノ酸配列決定を示す図である。

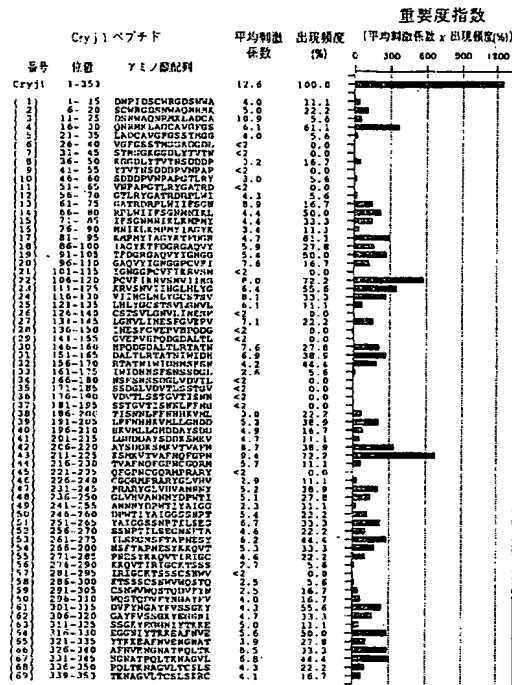
【図16】図16は、スギ花粉特異的T細胞エピトープペプチドとヒノキ花粉特異的T細胞エピトープペプチドからなる多重エピトープペプチドに対するスギ花粉症患者及びヒノキ花粉症患者のリンパ球の反応性を示す図である。

【図17】図17は、Cry j 1#22coreペプチドのアミノ酸置換アナログペプチドに対するT細胞クローンPJ7-9の増殖応答性およびその際のサイトカイン産生量を示す図である。 30

【図18】図18は、同上アナログペプチドに対するT細胞クローンPB10-18の増殖応答性およびその後のサイトカインの産生量を示す図である。

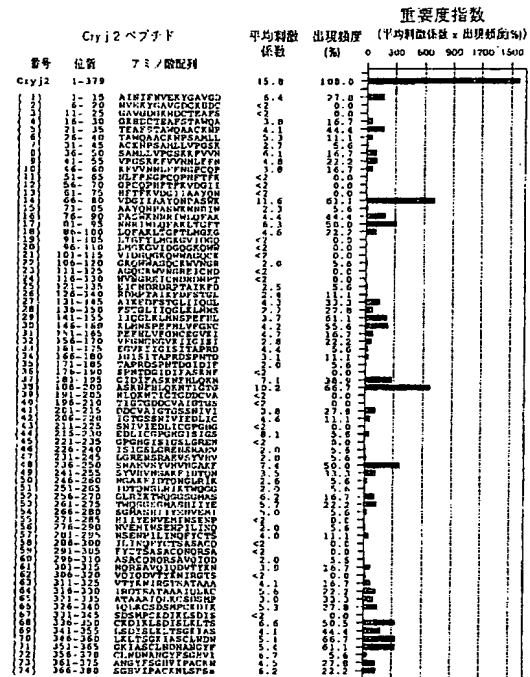
【図 1】

図 1



【図 2】

図 2



【図 3】

図 3

Cry j1 を認識する T 細胞クローンの Th タイプ

T 細胞 クローン	エピトープ部位		拘束分子	リンフォカイン産生(pg/ml)			Th* タイプ
	番号	位置		IL 2	IFN $\gamma$	IL 4	
PJ4-5	4	16-30	DQA1*0102-DQB1*0602	<31	1500	334	Th0
PR8-1	4	15-30	-	<31	<31	814	Th2
PB9-37	13	61-75	DPA1*0101-DPB1*0501	<31	<31	7760	Th2
PB10-24	13	61-75	-	39	151	4500	Th2
PJ1-27	19	91-105	DQ	32	1220	224	Th0
PB3-27	22	106-120	DRB5*0101	250	332	21000	Th2
PB8-2	22	106-120	-	190	2110	5709	Th0
PB8-3	22	106-120	-	<31	1270	10100	Th0
PB9-39	22	106-120	-	48	51	5120	Th0
PB10-18	22	106-120	-	410	45	7840	Th2
PJ4-29	22	106-120	-	4580	14200	6630	Th0
PJ7-9	22	106-120	-	1370	1040	12200	Th2
PJ5-6	30	145-160	DQA1*0102-DQB1*0602	1500	1170	5920	Th0
PJ5-9	30	145-160	-	1720	825	266	Th0
PB11-21	31	151-165	DRB1*0901	4190	>20000	4510	Th0
PR11-24	31	151-165	-	670	11700	1950	Th0
PR6-37	31	151-165	-	<31	<31	49	Th2
PB1-8	39	191-205	DQA1*0102-DQB1*0602	820	188	1760	Th0
PB9-34	39	191-205	DRB1*0901又はDRB4*0101	<31	86	1600	Th2
PB2-14	43	211-225	DPA1*0101-DPB1*0501	<31	376	2320	Th0
PB7-2	43	211-225	-	84	2140	2080	Th0
PR8-32	43	211-225	-	<31	4870	1040	Th0
PR8-34	43	211-225	-	78	14800	3040	Th0
PR11-23	43	211-225	-	<31	3990	1260	Th0
PB11-26	43	211-225	-	32	1100	6520	Th0
PB4-20	43	211-225	-	<31	<31	133	Th2
PD10-4	43	211-225	-	<31	<31	4170	Th2
PB8-4	51	251-265	DQA1*0102-DQB1*0602	44	36	4050	Th2
PJ4-20	66	326-340	DQA1*0102-DQB1*0602	560	3080	<32	Th1

\*IL 4/IFN $\gamma$  >10 を Th2, IFN $\gamma$ /IL 4 >10 を Th1, その中間を Th0 と定義する。

【図 4】

図 4

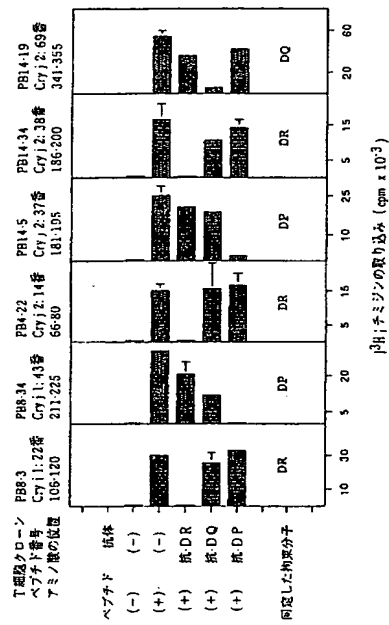
Cry j2 を認識する T 細胞クローンの Th タイプ

T 細胞 クローン	エピトープ部位		拘束分子	リンフォカイン産生(pg/ml)			Th* タイプ
	番号	位置		IL 2	IFN $\gamma$	IL 4	
PR5-29	4	16-30	DRB1*0901又はDRB4*0101	<31	503	97	Th0
PB11-40	4	16-30	-	<31	<31	50	Th2
PB14-4	4	16-30	-	<31	<31	<16	Thp
PD12-33	8	36-50	DRB1*1501	<31	>8000	<16	Th1
PR2-25	8	36-50	-	47	<31	977	Th2
PR5-40	8	36-50	-	1150	1330	355	Th0
PB3-32	14	66-80	DRB5*0101	<31	<31	323	Th2
PB4-21	14	66-80	-	<31	105	239	Th0
PR6-22	14	66-80	-	<31	483	158	Th0
PC1-8	14	66-80	-	<31	2710	32	Th1
PR4-20	14	66-80	-	<31	312	338	Th0
PR3-21	14	66-80	-	<31	<31	330	Th2
PB13-18	17	76-90	DPA1*0101-DPB1*0501	<31	3320	231	Th1
PB11-32	17	76-90	-	138	60	2090	Th2
PR1-20	31	151-165	DRB1*0901	<31	<31	18	Th2
PR4-39	31	151-165	-	<31	<31	<16	Thp
PB14-5	37	181-195	DPA1*0101-DPB1*0201	87	126	469	Th0
PB14-13	37	181-195	-	<31	59	2440	Th2
PB14-34	38	186-200	DRB4*0101	185	420	93	Th0
PC3-40	38	186-200	-	<31	<31	379	Th2
PB5-3	48	236-250	DRB1*1501又はDRB5*0101	2570	>8000	525	Th1
PR2-34	65	321-335	DRB1*0901	57	1990	464	Th0
PR3-30	66	326-340	DQA1*0102-DQB1*0602	<31	106	<80	Th1
PR5-18	66	326-340	-	<31	<31	<16	Thp
PC1-13	68	336-350	DPA1*0702-DPB1*0501	<31	<31	<16	Thp
PB17-8	69	341-355	DQA1*0102-DQB1*0602	<31	3210	<16	Th1
PR5-12	69	341-355	-	<31	<31	2528	Th2
PB17-31	69	341-355	-	<31	<31	332	Th2
PB14-19	70	346-360	-	<31	3730	<16	Th1
PB13-38	70	346-360	-	<31	2020	<16	Th1

\*IL 4/IFN $\gamma$  >10 を Th2, IFN $\gamma$ /IL 4 >10 を Th1, その中間を Th0, リンフォカイン産生が認められない場合を Thp と定義する。

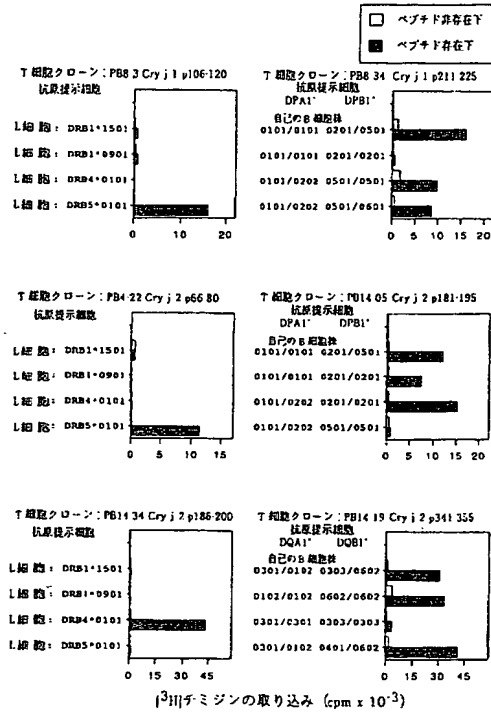
【図 5】

図 5



【図 6】

図 6



【図 7】

図 7

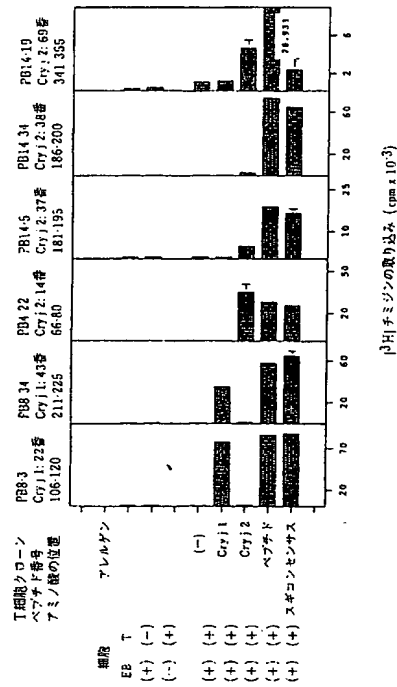
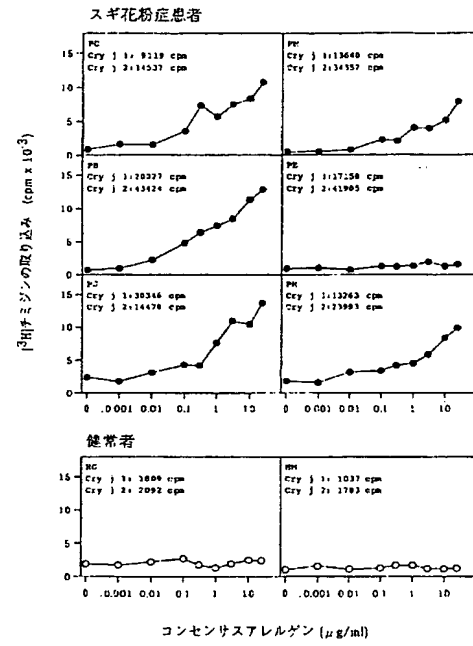
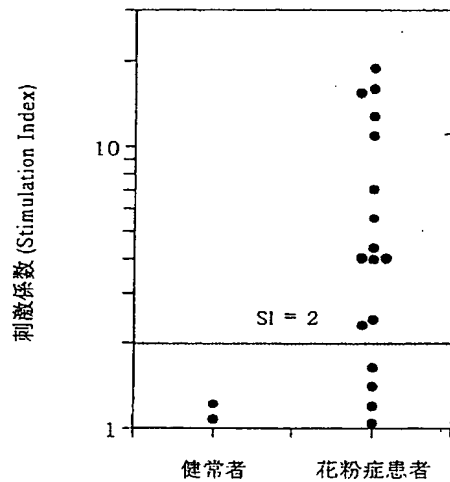
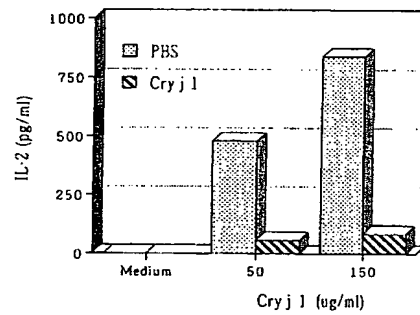
- a Lys Ser Met Lys Val Thr Val Ala Phe Asn Gln Phe Gly Pro Asn  
 b Pro Cys Val Phe Ile Lys Arg Val Ser Asn Val Ile Ile His Gly  
 c Val Asp Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Gln Asn Pro Ala Ser Trp Lys  
 d Gly Ile Asp Ile Phe Ala Ser Lys Asn Phe His Leu Gln Lys Asn Thr Ile  
 Gly Thr Gly  
 e Leu Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala Ser Cys Leu Asn Asp Asn Ala Asn  
 Gly Tyr Phe

【図 8】

図 8

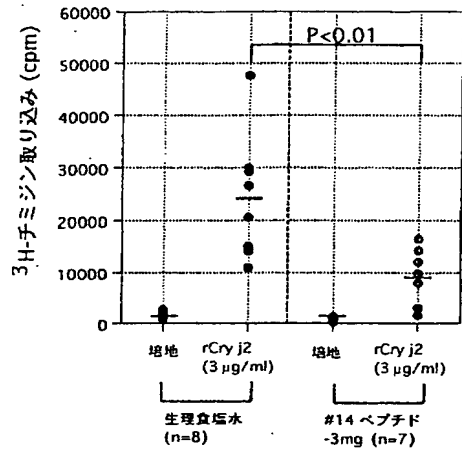
ペプチド組成物 (#1~#6) のヒト IgE との反応性

試料番号 (単位)	フラクション	分子量 (kDa)	C.A.#1	C.A.#2	C.A.#3	C.A.#4	C.A.#5	C.A.#6
1	31	3105	3	4	4	4	4	4
2	31	1333	3	4	4	4	4	4
3	31	1126	3	4	4	4	4	4
4	31	1095	3	4	4	4	4	4
5	31	1047	3	4	4	4	4	4
6	31	1047	3	4	4	4	4	4
7	31	1047	3	4	4	4	4	4
8	31	1047	3	4	4	4	4	4
9	31	1047	3	4	4	4	4	4
10	31	1047	3	4	4	4	4	4
11	31	1047	3	4	4	4	4	4
12	31	1047	3	4	4	4	4	4
13	31	1047	3	4	4	4	4	4
14	31	1047	3	4	4	4	4	4
15	31	1047	3	4	4	4	4	4
16	31	1047	3	4	4	4	4	4
17	31	1047	3	4	4	4	4	4
18	31	1047	3	4	4	4	4	4
19	31	1047	3	4	4	4	4	4
20	31	1047	3	4	4	4	4	4
21	31	1047	3	4	4	4	4	4
22	31	1047	3	4	4	4	4	4
23	31	1047	3	4	4	4	4	4
24	31	1047	3	4	4	4	4	4
25	31	1047	3	4	4	4	4	4
26	31	1047	3	4	4	4	4	4
27	31	1047	3	4	4	4	4	4
28	31	1047	3	4	4	4	4	4
29	31	1047	3	4	4	4	4	4
30	31	1047	3	4	4	4	4	4
31	31	1047	3	4	4	4	4	4
32	31	1047	3	4	4	4	4	4
33	31	1047	3	4	4	4	4	4
34	31	1047	3	4	4	4	4	4
35	31	1047	3	4	4	4	4	4
36	31	1047	3	4	4	4	4	4
37	31	1047	3	4	4	4	4	4
38	31	1047	3	4	4	4	4	4
39	31	1047	3	4	4	4	4	4
40	31	1047	3	4	4	4	4	4
41	31	1047	3	4	4	4	4	4
42	31	1047	3	4	4	4	4	4
43	31	1047	3	4	4	4	4	4
44	31	1047	3	4	4	4	4	4
45	31	1047	3	4	4	4	4	4
46	31	1047	3	4	4	4	4	4
47	31	1047	3	4	4	4	4	4
48	31	1047	3	4	4	4	4	4
49	31	1047	3	4	4	4	4	4
50	31	1047	3	4	4	4	4	4
51	31	1047	3	4	4	4	4	4
52	31	1047	3	4	4	4	4	4
53	31	1047	3	4	4	4	4	4
54	31	1047	3	4	4	4	4	4
55	31	1047	3	4	4	4	4	4
56	31	1047	3	4	4	4	4	4
57	31	1047	3	4	4	4	4	4
58	31	1047	3	4	4	4	4	4
59	31	1047	3	4	4	4	4	4
60	31	1047	3	4	4	4	4	4
61	31	1047	3	4	4	4	4	4
62	31	1047	3	4	4	4	4	4
63	31	1047	3	4	4	4	4	4
64	31	1047	3	4	4	4	4	4
65	31	1047	3	4	4	4	4	4
66	31	1047	3	4	4	4	4	4
67	31	1047	3	4	4	4	4	4
68	31	1047	3	4	4	4	4	4
69	31	1047	3	4	4	4	4	4
70	31	1047	3	4	4	4	4	4
71	31	1047	3	4	4	4	4	4
72	31	1047	3	4	4	4	4	4
73	31	1047	3	4	4	4	4	4
74	31	1047	3	4	4	4	4	4
75	31	1047	3	4	4	4	4	4
76	31	1047	3	4	4	4	4	4
77	31	1047	3	4	4	4	4	4
78	31	1047	3	4	4	4	4	4
79	31	1047	3	4	4	4	4	4
80	31	1047	3	4	4	4	4	4
81	31	1047	3	4	4	4	4	4
82	31	1047	3	4	4	4	4	4
83	31	1047	3	4	4	4	4	4
84	31	1047	3	4	4	4	4	4
85	31	1047	3	4	4	4	4	4
86	31	1047	3	4	4	4	4	4
87	31	1047	3	4	4	4	4	4
88	31	1047	3	4	4	4	4	4
89	31	1047	3	4	4	4	4	4
90	31	1047	3	4	4	4	4	4
91	31	1047	3	4	4	4	4	4
92	31	1047	3	4	4	4	4	4
93	31	1047	3	4	4	4	4	4
94	31	1047	3	4	4	4	4	4
95	31	1047	3	4	4	4	4	4
96	31	1047	3	4	4	4	4	4
97	31	1047	3	4	4	4	4	4
98	31	1047	3	4	4	4	4	4
99	31	1047	3	4	4	4	4	4
100	31	1047	3	4	4	4	4	4

【図 9】  
図 9【図 10】  
図 10【図 11】  
図 11【図 12】  
図 12

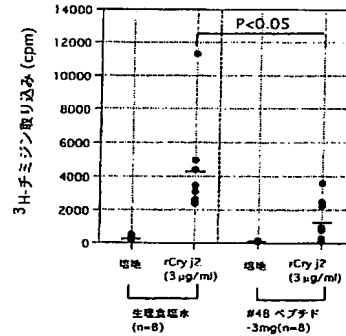
【図 13】

図 13



【図 14】

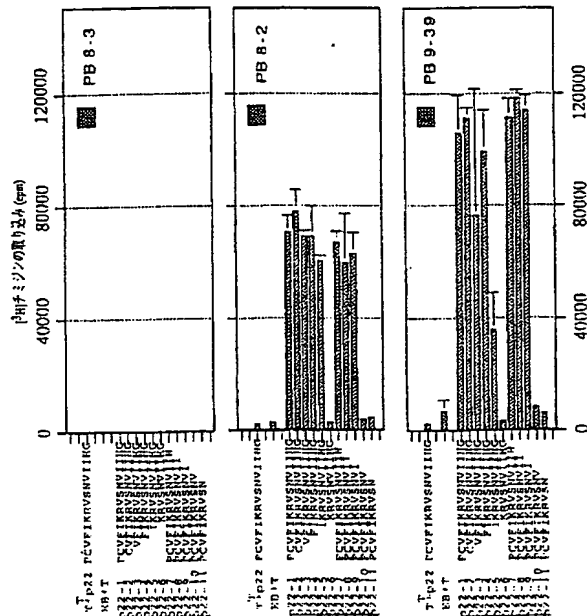
図 14



【図 15 - 1】

図 15

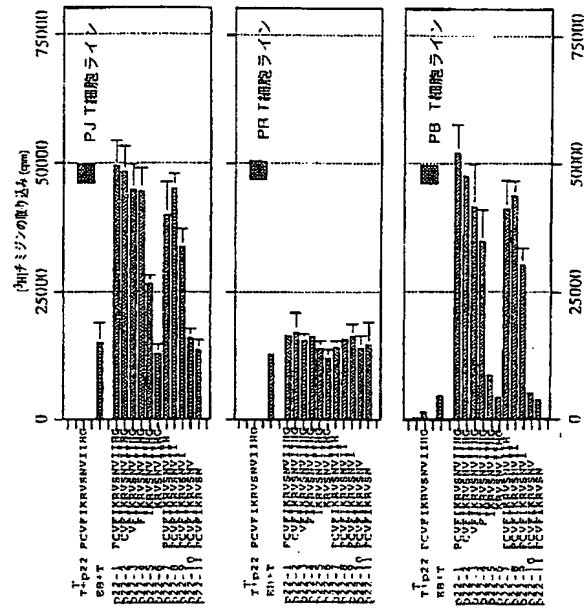
## T細胞クローン



【図 15 - 2】

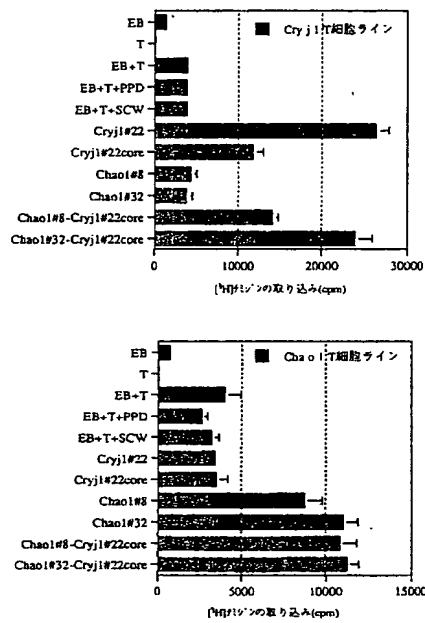
図 15 続き

## T細胞ライン



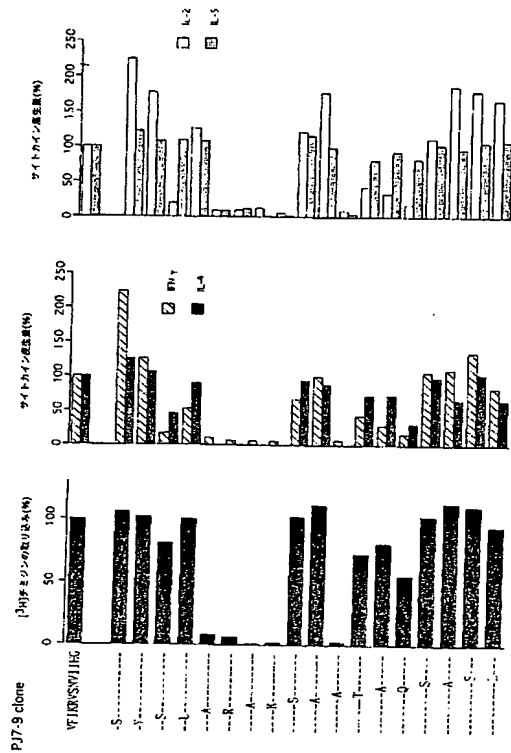
【図 16】

図 16



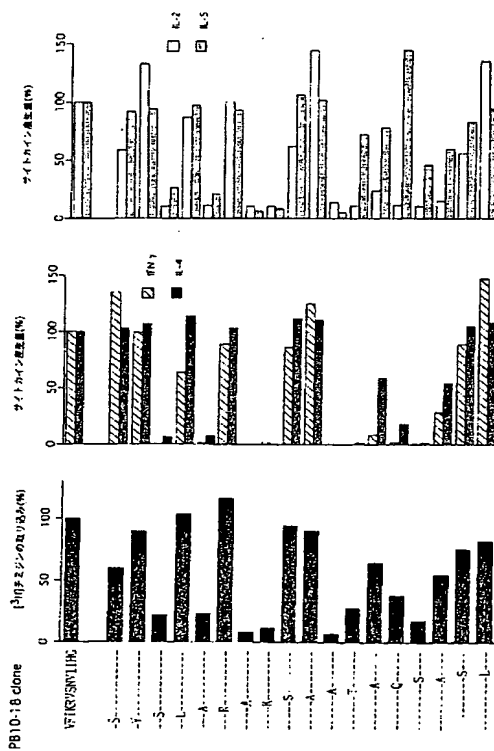
【図 17】

図 17



【図 18】

図 18



## 【配列表】

2005126447000001.app

## 【手続補正書】

【提出日】平成17年2月21日(2005.2.21)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

スギ花粉アレルゲンから単離された少なくとも1つのT細胞エピトープペプチド、及びヒノキ花粉アレルゲンから単離された少なくとも1つのT細胞エピトープペプチドを、ペプチド結合を介して連結した単一のポリペプチドであって、以下の性質を有する多重T細胞エピトープポリペプチド：

(a) スギ花粉アレルゲンがCry j 1及び／又はCry j 2であり、ヒノキ花粉アレルゲンがCha o 1及び／又はCha o 2である。

(b) 上記ポリペプチドを構成する各T細胞エピトープポリペプチドに特異的なT細胞クローンを増殖させることができる。

(c) スギ花粉症患者及びヒノキ花粉症患者のアレルゲン特異的IgE抗体と実質的に結合しない。

## 【請求項2】

スギ花粉アレルゲンがCry j 1であり、ヒノキ花粉アレルゲンがCha o 1である、請求項1に記載の多重T細胞エピトープポリペプチド。

## 【請求項3】

T細胞エピトープペプチドの間に抗原提示細胞内でプロセッシングを受ける部位を介在させた、請求項1に記載の多重T細胞エピトープポリペプチド。

## 【請求項4】

プロセッシングを受ける部位がアルギニンダイマー(-Arg-Arg-)、又はリジンダイマー(-Lys-Lys-)である、請求項3に記載の多重T細胞エピトープポリペプチド。

## 【請求項5】

システイン(Cys)残基を含まない、請求項1～4のいずれか一項に記載の多重T細胞エピトープポリペプチド。

## 【請求項6】

配列番号：5、又は配列番号：6のアミノ酸配列のいずれかのアミノ酸配列を含む、請求項1に記載の多重T細胞エピトープポリペプチド。

## 【請求項7】

配列番号：5、又は配列番号：6のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドにおいて、各アミノ酸配列において23番目のフェニルアラニンがセリンに置換されている、請求項1に記載の多重T細胞エピトープポリペプチド。

## 【請求項8】

請求項6又は7のいずれか一項に記載されたポリペプチドにおいて、アミノ酸が置換、欠失及び／又は挿入されたポリペプチドであって、以下の性質を有する多重T細胞エピトープポリペプチド：

(a) 上記ポリペプチドを構成する各T細胞エピトープペプチドに特異的なT細胞クローンを増殖させることができる。

(b) 上記T細胞エピトープペプチドの間に、抗原提示細胞内でプロセッシングを受ける部位が介在する。

(c) システイン残基を含まない。

(d) スギ花粉症患者及びヒノキ花粉症患者のアレルゲン特異的IgE抗体と実質的に結



合しない。

【請求項 9】

請求項 1～8 のいずれか一項に記載の多重 T 細胞エпитープポリペプチドを有効成分として含有するスギ花粉症及び／又はヒノキ花粉症の予防、又は治療剤。

【請求項 10】

さらに薬学的に許容できる担体、又は希釈剤を含む、請求項 9 に記載の予防、又は治療剤。

【請求項 11】

スギ花粉症及び／又はヒノキ花粉症の予防、又は治療のために用いられる薬剤の調製における、請求項 1～8 のいずれか一項に記載の多重 T 細胞エпитープポリペプチドの使用。

【請求項 12】

スギ花粉アレルゲンから単離された少なくとも 1 つの T 細胞エпитープポリペプチドを、ペプチド結合を介して連結した単一のポリペプチドであって、以下の性質を有する多重 T 細胞エпитープポリペプチド：

- (a) スギ花粉アレルゲンが Cry j 1 及び／又は Cry j 2 である。
- (b) 上記ポリペプチドを構成する各 T 細胞エпитープポリペプチドに特異的な T 細胞クローンを増殖させることができる。
- (c) スギ花粉症患者のアレルゲン特異的 Ig E 抗体と実質的に結合しない。

【請求項 13】

上記 T 細胞エпитープポリペプチドの間に抗原提示細胞内でプロセッシングを受ける部位を介在させた、請求項 12 に記載の多重 T 細胞エпитープポリペプチド。

【請求項 14】

上記プロセッシングを受ける部位がアルギニンダイマー (-Arg-Arg-)、又はリジンダイマー (-Lys-Lys-) である、請求項 13 に記載の多重 T 細胞エпитープポリペプチド。

【請求項 15】

システイン (Cys) 残基を含まない、請求項 12～14 のいずれか一項に記載の多重 T 細胞エпитープポリペプチド。

【請求項 16】

多重 T 細胞エпитープポリペプチドを構成する各 T 細胞エпитープポリペプチドを拘束する抗原分子からなる群が、HLA-DR、HLA-DQ、及び HLA-DP をすべて含む、請求項 12 に記載の多重 T 細胞エпитープポリペプチド。

【請求項 17】

抗原分子からなる群が DRB5\*0101、DRB4\*0101、DQA1\*0102-DQB1\*0602、DPA1\*0101-DPB1\*0501、及び DPA1\*0101-DPB1\*0201 分子である、請求項 16 に記載の多重 T 細胞エпитープポリペプチド。

【請求項 18】

配列番号：1、配列番号：2、または配列番号：3 のいずれかのアミノ酸配列を含む、請求項 12 に記載の多重 T 細胞エпитープポリペプチド。

【請求項 19】

配列番号：1、配列番号：2、または配列番号：3 のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドにおいて、各アミノ酸配列において 17 番目のフェニルアラニンがセリンに置換されている、請求項 12 に記載の多重 T 細胞エпитープポリペプチド。

【請求項 20】

図 7 の a～e に記載の各エпитープポリペプチドを含む多重 T 細胞エпитープポリペプチドであって、各エпитープポリペプチドの間はアルギニンダイマー (-Arg-Arg-) によって連結され、かつ各エпитープポリペプチドが (1) a-b-c-d-e、(2) a-b-c-e-d、(3) a-b-d-c-e、(4) a-b-d-e-c、(5) a-b-e-c-d、または (6) a-b-e-d-c のいずれかの順に連結されている、請求項 12 に記載の多重 T 細胞エпитープポリペプチド。

## 【請求項 21】

図 7 の b で示されるアミノ酸配列において 4 番目のフェニルアラニンがセリンに置換されている、請求項 20 に記載の多重 T 細胞エпитープポリペプチド。

## 【請求項 22】

請求項 18～21 のいずれか一項に記載されたポリペプチドにおいて、アミノ酸が置換、欠失及び／又は挿入されたポリペプチドであって、以下の性質を有する多重 T 細胞エпитープポリペプチド：

- (a) 上記ポリペプチドを構成する各 T 細胞エпитープペプチドに特異的な T 細胞クローンを増殖させることができる。
- (b) 上記 T 細胞エпитープペプチドの間に、抗原提示細胞内でプロセッシングを受ける部位が介在する。
- (c) システイン残基を含まない。
- (d) スギ花粉症患者のアレルゲン特異的 I g E 抗体と実質的に結合しない。

## 【請求項 23】

請求項 12～22 のいずれか一項に記載の多重 T 細胞エпитープポリペプチドを有効成分として含有するスギ花粉症の予防、又は治療剤。

## 【請求項 24】

さらに、薬学的に許容できる担体、又は希釈剤を含む請求項 23 に記載の予防、又は治療剤。

## 【請求項 25】

スギ花粉症の予防、又は治療のために用いられる薬剤の調製における、請求項 12～22 のいずれか一項に記載の多重 T 細胞エпитープポリペプチドの使用。

## 【請求項 26】

ヒノキ花粉アレルゲンから単離された少なくとも 1 つの T 細胞エпитープペプチドを、ペプチド結合を介して連結した単一のポリペプチドであって、以下の性質を有する多重 T 細胞エпитープポリペプチド：

- (a) ヒノキ花粉アレルゲンが Cha o 1 及び／又は Cha o 2 である。
- (b) 上記ポリペプチドを構成する各 T 細胞エпитープポリペプチドに特異的な T 細胞クローンを増殖させることができる。
- (c) ヒノキ花粉症患者のアレルゲン特異的 I g E 抗体と実質的に結合しない。

## 【請求項 27】

上記 T 細胞エпитープペプチドの間に抗原提示細胞内でプロセッシングを受ける部位を介在させた、請求項 26 に記載の多重 T 細胞エпитープポリペプチド。

## 【請求項 28】

プロセッシングを受ける部位がアルギニンダイマー (-Arg-Arg-)、又はリジンダイマー (-Lys-Lys-) である、請求項 27 に記載の多重 T 細胞エпитープポリペプチド。

## 【請求項 29】

システイン (Cys) 残基を含まない、請求項 26～28 のいずれか一項に記載の多重 T 細胞エпитープポリペプチド。

## 【請求項 30】

アミノ酸配列 IFSKNLNLIKLNMPYIAGNK 及び／又はアミノ酸配列 SSGKNEGNTNIYNNNEAFKVE を含む、請求項 26～29 のいずれか一項に記載の多重 T 細胞エпитープポリペプチド。

## 【請求項 31】

請求項 26～30 のいずれか一項に記載の多重 T 細胞エпитープポリペプチドを有効成分として含有するヒノキ花粉症の予防、又は治療剤。

## 【請求項 32】

さらに、薬学的に許容できる担体、又は希釈剤を含む請求項 31 に記載の予防、又は治療剤。

## 【請求項 33】

ヒノキ花粉症の予防、又は治療のために用いられる薬剤の調製における、請求項 26～

30のいずれか一項に記載の多重T細胞エピトープポリペプチドの使用。

---

フロントページの続き

(72)発明者 大力 一雄

神奈川県小田原市成田 5 4 0 番地 明治乳業株式会社ヘルスサイエンス研究所内

(72)発明者 岩間 亜希子

神奈川県小田原市成田 5 4 0 番地 明治乳業株式会社ヘルスサイエンス研究所内

(72)発明者 紀 光助

神奈川県小田原市成田 5 4 0 番地 明治乳業株式会社ヘルスサイエンス研究所内

F ターム(参考) 4C084 AA01 AA02 BA01 BA08 CA26 DA06 NA14 ZB132

4H045 AA11 AA30 BA10 CA30 DA86 EA22

**\* NOTICES \***

**JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.**

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

**CLAIMS**

[Claim(s)]

[Claim 1]

It is the straight chain-like polypeptide of one molecule which connected a different T cell epitope field,

- (1) The significance characteristic which each of said T cell epitope field measured in the patient ensemble of susceptibility to said allergen shows about 100 or more,
- (2) React to said allergen with at least 70% or more of patient's of the patient ensemble's of susceptibility's peripheral blood lymphocyte,
- (3) The peptide immunotherapy agent characterized by containing the effective dose of the IgE antibody of the patient ensemble of susceptibility to said allergen, and the multiplex epitope peptide which does not react substantially.

[Claim 2]

The peptide immunotherapy agent according to claim 1 which is that to which a different T cell epitope field originates in two or more sorts of different allergen molecules.

[Claim 3]

The peptide immunotherapy agent according to claim 2 whose different allergen molecule is the cedar pollen allergen Cry j1 and Cry j2.

[Claim 4]

The peptide immunotherapy agent according to claim 1 which made the part which receives processing within an antigen presenting cell intervene between each T cell epitope fields.

[Claim 5]

The peptide immunotherapy agent according to claim 4 whose part which receives processing in an antigen presenting cell is an arginine dimer.

[Claim 6]

Array number: The peptide immunotherapy agent according to claim 3 which is

the peptide which includes the amino acid sequence of a publication in either 1, array number:2 or array number:3.

[Claim 7]

The peptide immunotherapy agent containing the epitope which uses at least one of the HLA class II molecule DRB 5\*0101, DRB 4\*0101, DQA1\*0102-DQB 1\*0602, DPA1\*0101-DPB 1\*0501, or the DPA1\*0101-DPB(s) 1\*0201 as a restricted molecule according to claim 3.

[Claim 8]

The peptide immunotherapy agent according to claim 2 whose different allergen molecules are the cedar pollen allergen Cry j 1 and cypress pollen allergen Cha O 1.

[Claim 9]

Array number: The peptide immunotherapy agent according to claim 8 which is the peptide which includes the amino acid sequence of a publication in 4 or array number:5.

[Translation done.]

**\* NOTICES \***

**JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.**

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

**DETAILED DESCRIPTION**

[Detailed Description of the Invention]

[Field of the Invention]

[0001]

This invention relates to a multiplex epitope peptide effective in the peptide immunotherapy over the allergosis.

[Background of the Invention]

[0002]

The allergosis is defined as the disease group by the functional disorder which the I-beam anaphylaxis (hypersensitivity) immunoreaction, i.e., the I-beam immunoreaction through an IgE antibody, became a base, and was produced, or the failure. The symptoms are pollinosis, bronchial asthma, allergic rhinitis, atopic dermatitis, an anaphylactic shock, etc. Although pollinosis is the typical disease of the allergosis and about 10% of people are troubled by hay fever in our country, in addition, as for the number, the increment is being enhanced. In the U.S., it is surmised that there is a patient of ragweed pollinosis 5 to 15%. Thus, also socially [ pollinosis ] from repeating every year, once the symptoms is shown [ being accompanied by hard symptoms, such as that there are many the patients, itching of an eye, a runny nose, a sneeze, and nasal congestion, and ] etc., and economically it is a big problem, and is anxious for development of a fundamental cure.

[0003]

The research on formation of an I-beam allergic response is important in an understanding and therapy of the allergosis. It is focused on the early reaction in current and an allergen specific immunoreaction, and the elucidation of the mechanism of allergic response control according to a T cell especially. It depends for initiation of the immunoreaction to the outpatient department antigen containing allergen on the antigen presenting cell of an immune system. A B cell, a macrophage, and the antigen presenting cell containing a dendritic cell incorporate an outpatient department antigen, hold it in the pocket which even an antigen peptide (T cell epitope peptide) fragments, and is formed with the alpha chain and beta chain of an MHC class II molecule (Homo sapiens HLA class II), are expressed to cell surface, and carry out antigen presentation to an antigen specific CD4 positivity helper T cell (Th cell). An HLA class II molecule consists of DR, DQ, and a DP molecule, the alpha chain of DR molecule is carried out by HLA-DRA, the code of the beta chain is carried out by HLA-DRB1, -DRB3, -DRB4, or -DRB5 gene, the alpha chain of DQ molecule is carried out by HLA-DQA1, the code of the beta chain is carried out by HLA-DQB1 gene, the alpha chain of DP molecule is carried out by HLA-DPA1, and the code of the beta chain is carried out by HLA-DPB1 gene. The pocket in which each gene except HLA-DRA holds an antigen peptide including much allele shows advanced polymorphism, and the structures differ delicately. Consequently, the class of antigen peptide which combines with a pocket and a T cell is shown is naturally restricted to the structure.

[0004]

Th cell which received the antigen information on HLA class II constraint nature through the T-cell receptor (TCR) is activated, makes a B cell specialize in a plasma cell, and guides an antibody production while increasing itself by secreting various cytokine. Th cell activated by the antigen stimulus is classified into Th0 cell which produces the cytokine of both interleukin 2 (IL-2), interferon gamma (IFN-gamma), Th1 cell that produces a tumor necrosis factor beta (TNF-beta), IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, and Th2 cell that produces IL-13 according to a difference of the production pattern of cytokine. Although production of the IgE antibody leading to allergy is promoted by IL-4 and IL-13, it is controlled by IFN-gamma. That is, Th1 cell controls production of IgE and Th2 cell promotes it. It can be said that it becomes settled whether the sensitization of allergy arises by whether Th1 cell works or Th2 cell works on the occasion of invasion of an antigen. It is actually known for the allergic subject that Th2 cell is working in dominance. An allergen specific IgE antibody is fixed to the basophilic leucocyte in peripheral blood, and the mast cell of an organization, the inflammatory mediator which an IgE antibody constructs a bridge on basophilic leucocyte or a mast cell through allergen, consequently contains a histamine, a prostaglandin, and leukotriene by invasion of the continuing allergen is emitted, and a sex allergic response is triggered instantly. These inflammatory mediators are answered, the lymphocyte accumulated on the part, monocyte, basophilic leucocyte, and eosinophile leucocyte are activated, and a delayed fire allergic response is triggered by separating the mediator which brings an organization various reactions including a failure.

[0005]

There is a desensitization therapy which used the allergen protein molecule for one of the attempts which are going to treat specific allergy by controlling an IgE antibody production in antigen-specific. In spite of a desensitization therapy's having a prolonged effect over the long period of time which cannot be obtained in pharmacotherapy and being close to the only fundamental therapy, the present condition is not necessarily recognized as a general cure. The point that that action mechanism is still unknown is got [ why this cure other than the danger of the side effects (swelling, an anaphylactic shock, etc. of a part) accompanying this cure is effective as that reason and ].

[0006]

Then, the view of the hyposensitization using the peptide antigen which has a T cell epitope appeared. It is thought that it is univalent even if the peptide fragment containing the T cell epitope on the allergen molecule used for this therapy approach does not contain the B cell epitope or contains it, and side effects, such as anaphylaxis, do not start it for the reason of being unable to carry out the crosslink of the high compatibility IgE receptor of a mast cell even if it medicates a patient with it. Furthermore, if a living body is medicated with a T cell epitope, the phenomenon in which a T cell is inactivated in antigen-specific (ANAJI, anergy) is known (La Salle JM, et al.:J.Exp.Med.176:177-186, 1992). The animal experiment of the hyposensitization using the peptide which contains the main T cell epitope of the hair allergen Fel d 1 of a cat in the basis of such a theoretical background is conducted. It is reported that T cell ANAJI is guided by in vitro (Briner, T.J.et al.:Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 90:7608-7612, 1994). Now this peptide The clinical trial of the used hyposensitization is performed (it Norman(s)), P.S.et al.: Am.J. Respir.Crit.Care Med.154 : 1623-1628, 1996; Simons, F.E.et al.: Int.Immunol.8 : 1937-1945, 1996. The desensitization therapy using the peptide containing the main T cell epitope on such an allergen molecule is called "Peptide-based Immunotherapy" (peptide immunotherapy or peptide desensitization therapy).

[0007]

As a basis of selection of the T cell epitope peptide used for peptide immunotherapy, the significance characteristic (Positivity Index; an average of T cell modal participation factor x frequency of occurrence) is devised (the international public presentation 94th / No. 01560). Moreover, there is a report that the versatility of the HLA haplotype in a patient ensemble should be covered on the occasion of a peptide design (B.P.& Gefter M[ Wallrer and ].L.: Allergy, 49:302-308, 1994).

[0008]

"A T cell epitope or a T cell epitope peptide" means the antigen peptide containing the T cell epitope which has the activation ability (for example, regarded as cytokine production or DNA synthesis) of an allergen specific T cell, and this epitope.

[Description of the Invention]

[Problem(s) to be Solved by the Invention]

[0009]

There are much those who have a specific IgE antibody in each of two or more kinds of different allergen molecules among allergic subjects. It is required for the fundamental therapy of allergy to develop a peptide immunotherapy agent effective also in such a patient. However, every time such [ until now ] an immunotherapy agent is developed, it is not broken, and such the way of thinking is not shown in the above-mentioned reference, either. Therefore, this invention makes it a technical problem to offer an effective peptide immunotherapy agent to two or more sorts of different allergen also at the allergic subject of susceptibility.

[0010]

To cedar pollen main allergen Cry j 1 ( ) [ Yasueda, ] [ H. ] et al.: J. Allergy Clin. Immunol. 71:77-86, 1983, and Cry j 2 ( ) [ Taniai, M. et al.: FEBS Letter 239:329-332, 1988; Sakaguchi, ] [ M. et ] al.: Allergy 45 : Although there are 309-312 and 1990 It gets down, 90% or more of a hay fever patient -- Cry j1 and Cry j2 -- the specific IgE antibody which is alike, respectively and receives -- \*\*\*\* -- remaining 10 a little less than % of patient It has a specific IgE antibody to either Cry j 1 or Cry j 2 (Hashimoto, M. et al.: Clin. Exp. Allergy 25:848-852, 1995). Therefore, when only Cry j 1 used the T cell epitope of only Cry j 2 for peptide immunotherapy [ as opposed to hay fever in this invention persons ], it thought that sufficient effectiveness was not expectable to 90% of a patient, and the multiplex epitope which contains the T cell epitope of Cry j 1 and the T cell epitope of Cry j 2 in the same intramolecular was produced. And the multiplex epitope peptide concerned activated a hay fever sufferer's T cell in vitro, it did not react with the IgE antibody of the patient concerned, but it became clear guiding an immune response also in vivo using a mouse from a header and this new knowledge that the multiplex epitope peptide concerned is effective as a peptide immunotherapy agent to a hay fever patient.

[0011]

this invention persons develop this view. Furthermore, with the case of hay fever Since there are many examples which discover a clinical manifestation also to cypress pollen, the multiplex epitope which contains the T cell epitope (Japanese Patent Application No. No. 153527 [ eight to ] ) of cypress pollen allergen Cha o 1 and the T cell epitope of the cedar pollen allergen Cry j 1 in the same intramolecular is produced. The multiplex epitope peptide concerned found out activating the T cell of the hay fever patient who does not react, and a cypress hay fever sufferer to each T cell epitope. Based on these new knowledge, it became clear that the design of such a multiplex epitope was not limited to cedar pollen allergen and cypress pollen allergen, but it could apply to the T cell epitope of other various allergen origins.

[0012]

As a basis of selection of the T cell epitope at the time of designing a multiplex epitope so that effectiveness may be expected from further again more many patients It can set into a patient ensemble (also including a race). HLA While considering so that the epitope which investigates haplotype and is combined with HLA with the high frequency of occurrence of the HLA haplotype in the population may be chosen if possible When antigen presentation of each epitope is not carried out with same the HLA class II molecule as possible and it selected the T cell epitope peptide by which antigen presentation is carried out with a different HLA class II molecule of a type, it clarified making the patient for effective expand further.

[Means for Solving the Problem]

[0013]

That is, this invention becomes each claim of a claim from invention of a publication.

[0014]

Although this invention is explained to the patient of susceptibility, or its both sides about the design of a multiplex epitope peptide effective in the patient of susceptibility with cedar pollen or cypress pollen below, this invention is not limited to such allergen by only the patient of susceptibility. For example, other allergen by which the primary structure is already clarified For example, a ragweed (Amba1, Amba2, Amba5, Ambt5, Ambp5), Plants pollen, such as KAMOGAYA (Dacg2) and HOSOMUGI (Lolp1, Lolp2, Lolp3), The technical thought of this invention may be applied also to tree pollen, such as an alder (Alng1), a hippo (Betv1, Betv2), Maung Teng Seda - (Juns1), and an EMPITSU juniper (Junv1), or various allergen which are not indicated in addition to this here.

[0015]

in this specification, a "multiplex epitope peptide" means the peptide which connected the peptide (an antigen peptide -- or it is also only called a peptide) with which the T cell epitope of the different allergen molecule origin is contained in the shape of a straight chain, and was used as one molecule. Moreover, it is desirable to make the field cut within an antigen presenting cell intervene between the peptide fields containing a T cell epitope, in order to decrease possibility that the epitope part newly recognized will be generated. As a result, since a multiplex epitope peptide is cut by each antigen peptide in this cutting field, effectiveness equivalent to the case where the antigen peptide according to individual is prescribed for the patient as mixture is expected. In addition, although what kind of structure is sufficient as this cutting field as long as cutting is received in the living body, the arginine dimer or lysine dimer which is the recognition sequence of the cathepsin B which is the enzyme contained in a lysosome can be used for it.

[0016]

About the multiplex epitope peptide design of this invention, the cedar pollen allergen Cry j1 and Cry j2 is explained as an example.

[0017]

A hay fever patient peripheral blood lymphocyte is stimulated by Cry j1 or Cry j2, and T cell Rhine for every patient is produced. All the primary structures of Cry j1 (the international public presentation 94th / No. 01560) or Cry j2 (Komiya, N. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 201: 1201, 1994) By stimulating T cell Rhine established from the patient with the overlapping peptide of 15 amino-acid extent to cover, they are Cry j 1 or Cry j. The amino acid sequence recognized as a T cell epitope on dyad is identified ( drawing 1 , drawing 2 ).

[0018]

Next, the HLA class II molecule combined with these antigens peptide is typed.

[0019]

In the case of Homo sapiens, it is known by the locus of an HLA class II molecule that DR, DQ, and DP molecule exist. This means possibility that differentiation of a T cell is prescribed by the antigen presentation molecules DR, DQ, and DP which present an antigen. Therefore, it is determined in which of Th1 or Th2 cell the T cell which received antigen peptide information for of which locus origin the antigen peptide of Cry j1 or Cry j2 is shown by the antigen presentation molecule through DR, DQ, or DP molecule again tend to specialize [ tend ] using the T cell clone established for every patient ( drawing 3 , 4 ).

[0020]

It is clear differentiation's [ from drawing 3 and 4 ] to Th1, Th2, or Th0 after a stimulus of an antigen peptide not to be specified in the combination of a specific epitope and a specific HLA molecule. That is, if it is the peptide which includes a T cell epitope part at worst when selecting a peptide for the design of the multiplex epitope peptide of this invention, since a T cell can be stimulated, it can become the candidate of antigen peptide selection.

[0021]

The criteria which select the peptide for a multiplex epitope peptide design (1) Select a peptide first in the sequence that a significance characteristic (the international public presentation 94th / No. 01560) is high (however, a significance characteristic selects about 100 or more things). (2) When there is no difference in (3) significance characteristics which select the peptide which is using the HLA class II molecule with the high frequency of occurrence as the antigen presentation molecule not much, in order to raise effectiveness, it is selecting the peptide shown by the restricted molecule of a different type. That is, when choosing the T cell epitope of the allergen concerned to a certain allergosis, it is HLA



of a certain ensemble's allergic subject. The selection it is expected most that effectiveness is chooses a T cell epitope with the high gene frequency of the HLA haplotype of the population to which haplotype is analyzed and the patient ensemble belongs concerned. If it has a reverse way of speaking, the T cell epitope which carried out in this way and was chosen means that effectiveness may not no longer be accepted at all in other ensembles.

[0022]

for example, -- HLA DPB 1\*0501 of haplotype if it is made an example -- a certain allergosis -- a Japanese patient -- this -- HLA haplotype accepts by high frequency -- having -- this -- HLA Suppose that the T cell epitope of haplotype restriction nature was chosen. Most effectiveness is not expected from the patient of the allergosis with the peptide same at the people from North America chosen in this way on the other hand, because -- this -- HLA Although the gene frequency of haplotype in a Japanese ensemble is very as high as 39.0%, it is because it is very as low as 0.8% in a Negro ensemble 1.3% in the white ensemble in North America. From the people from North America HLA-DP If the T cell epitope of constraint nature is chosen DPB 1\*0401 etc. should be chosen (North America: 30.2% of whites, 11.1% of black men, Japanese:4.8%). Furthermore, it is important to select the peptide shown by the antigen presentation molecule of haplotype which is different even when the locus level from which an antigen presentation molecule differs like DR, DQ, and DP, or a locus was the same.

[0023]

Under the present circumstances, it is desirable that cysteine residue is not contained to the epitope part which should be selected. If cysteine residue is contained to the epitope part, it may combine with an HLA class II molecule nonspecific, and if immunity is carried out with the antigen peptide containing cysteine residue, originally the part which is not an antigen may be recognized as a new epitope. When recognized as an epitope, the epitope containing a cysteine is recognized by the 2nd time and 3rd peptide administration, and it is predicted that the danger that a side effect will appear becomes high.

[0024]

Hereafter, the example of a multiplex epitope design is shown. When the significance characteristic of Cry j1 and Cry j2 shown in [drawing 1](#) and [drawing 2](#) is used, the significance characteristic of the T cell epitope in Cry j1 has the highest amino acid number 211-225 (it is displayed as p211-225 below) (restricted molecule DPA1\*0101-DPB 1\*0501) of the peptide number of No. 43, and peptide number 22 No. p106-120 (restricted molecule DRB 5\*0101) is the 2nd. These two persons can select as an antigen peptide used for a multiplex epitope peptide. Moreover, peptide number 14 No. p66-80 (restricted molecule DRB 5\*0101) and 38 No. p186-200 (DRB 4\*0101) can select the significance characteristic in Cry j2 as an antigen peptide similarly [ it is high and ]. A restricted molecule is DPA1\*0101-DPB 1\*0201, and peptide number 37 No. p181-195 located before the peptide number of No. 38 of Cry j2 differ from the restricted molecule of No. 38, although a significance characteristic is 280. Peptide 37 No. p181-195 [ 10 residue ] overlap peptide number 38 No. p186-200, add 4 residue of No. 37 No. [ 38 ] ago, and can choose it as a peptide of HLA-DP molecule constraint nature. In the peptide selected so far, the antigen peptide in which DQ constraint nature is shown does not exist. Although DQA1\*0102-DQB 1\*0602 is a restricted molecule, since cysteine residue is contained in the center of an epitope, peptide number 4 No. p16-30 of Cry j1 cannot be selected. p341-360 applicable to the peptide number of No. 69-70 of Cry j2 are DQA1\*0102-DQB 1\*0602. Although it is the peptide shown, in the peptide of No. 70, the cysteine is contained also for this. However, since only the peptide of No. 69 which does not contain a cysteine can activate a T cell, only 12 residue (ISLKLTSGLIAS), p344-355 [ i.e., ], can be selected. moreover, the decision of the core array of the T cell epitope which used the T cell clone although peptide number 22 No. p106-120 of Cry j1 contained the cysteine in the 107th -- the minimum -- a required array is 9 residue of p109-117 (array (FIKRVSNVI) number: 4). That is, it can be used even if it removes p106-107 position Pro-Cys residue.

[0025]

The antigen incorporated in the antigen presenting cell is disassembled by rye ZOZOMU. The protein of foreignness is incorporated by the antigen presentation molecule, and a process is carried out to it what, and it is how. It is still unsolved whether it combines with an HLA class II molecule. However, in current, possibility that cathepsin B is participating in cutting of an antigen in this complicated device is pointed out (victory swamp Nobuhiko, Japanese Society for Immunology 25:75 (1995)).

[0026]

Some About an HLA class II type, the HLA affinity amino acid motif of an antigen peptide has been determined. Although association to an HLA class II molecule has singularity, if it is the peptide which fills a principle fixed also about a certain specific HLA class II type, the antigen peptide of a remarkable class is combinable (Rammensee, H.-G. et al. Immunogenetics. (1995) 41:178-228). For this reason, the epitope part newly recognized may be generated to the part which connected the antigen peptide. In order to avoid this, it is desirable to design a multiplex epitope peptide so that it may be cut within an antigen presenting cell for every antigen peptide. The peptide array which cathepsin B recognizes is an epitope array which adds Arg-Arg or Lys-Lys in the second half of the peptide containing an epitope, and follows a degree since it is hydrophobic-amino-acid-Arg-Arg or Lys-Lys. It arranges so that a hydrophobic amino acid sequence may be located following Arg-Arg or Lys-Lys.

[0027]

Although it is thought that it is not necessary to ask sequence since Arg-Arg was made to intervene between antigen peptides about the sequence of the array of the antigen peptide of this example It is related with the peptide number of No. 14 ( [drawing 2](#) R 2) of Cry j2. If Arg is connected in the second half of this peptide, Tyr of No. 73 serves as the first support, and the added Arg residue may serve as the 9th amino acid of the peptide linkage motif of DRB 5\*0101, and may serve as the second support. Consequently, it may be recognized as a new epitope. For this reason, as for this array, being located in the last of a multiplex epitope peptide is desirable.

[0028]

Thus, the obtained multiplex epitope peptide is shown in array number:1. The restricted molecules of this multiplex epitope are DRB 4\*0101, DRB 5\*0101, DPA1\*0101-DPB 1\*0201, DPA1\*0101-DPB 1\*0501, and DQA1\*0102-DQB 1\*0602. In the 11th international human leucocyte antigen meeting, such gene frequency in a Japanese ensemble is calculated (Tsuji, K. et al. HLA 1991 vol.1 (1992) Oxford University Press). 0.208 and DPB 1\*0501 are computed with 0.399, and DQB 1\*0602 is computed [ DRB 4\*0101 / 0.291 and DRB 5\*0101 ] for 0.056 (DRB 5\*0102 is 0.070) and DPB 1\*0201 with 0.053 (DQB 1\*0601 is 0.204). If antigen frequency is calculated from this value, it will be calculated with DRB4\*0101=0.50, DRB5\*0101=0.11 (DRB5\*0102=0.14), DPB1\*0201=0.37, DPB1\*0501=0.64 (observation of Hori et al. 0.79), and DQB1\*0602=0.10 (DQB1\*0601=0.37). Since linkage disequilibrium exists in DRB 5\*0101 and DQB 1\*0602 and it can consider that it is the same, the value of DRB 5\*0101 can be used. The probability which possesses both or one of the two of both types of DPB 1\*0201 and DPB 1\*0501 in a Japanese ensemble is calculated with 0.85. Moreover, the probability which possesses both or one of the two of DRB 4\*0101 and DRB 5\*0101 is calculated with 0.56. From this value to an array number: The patient who can recognize one or more T cell epitopes contained in the multiplex epitope peptide of 1 estimates it as 90% about. However, even if antigen information is shown by these restricted molecules by the T cell side also in the patient who possesses these HLA-types, it is unknown whether the T cell repertory which can recognize these epitope peptides exists. Moreover, since the number of epitopes for causing growth of a T cell is strange (it may be the two or more place need), it is thought that the ratio of consumed water of this multiplex epitope peptide falls. The result, i.e., 77%, order in the growth response of 17 persons' peripheral blood lymphocyte is predicted to be an appropriate value in fact.

[0029]

Furthermore, in order to make the staff for effective expand, the multiplex epitope peptide containing more T cell epitopes can also be designed. For example, the multiplex epitope peptide which connected 1 Cry jp213-225, p108-120, 2 Cry jp182-200, p79-98, 1 Cry jp80-95, and 1 Cry jp66-80 with this order (array number: 2), or 1 Cry jp213-225 and p108-120. They are 2 Cry jp182-200, p79-98, 1 Cry jp67-95, 2 Cry jp238-251, and the multiplex epitope peptide (array number: 3) that connected p66-80 with this order. Since these multiplex epitope peptides stimulate the peripheral blood lymphocyte of all 21 hay fever patients that investigated and do not react with a patient IgE antibody, they are effective as a

peptide immunotherapy agent. Such a view can be developed further, it can produce by the approach of showing the T cell epitope of the allergen, for example, cypress pollen allergen and cedar pollen allergen, from which a seed differs in an example 13, and expansion of effectiveness can also be cut further.

[0030]

In order to adjust the activity of a T cell, changing the antigen peptide part used for a multiplex epitope peptide is also included in this invention. An alteration is performing amino acid substitution of 1 or more residue, deletion, and insertion. It can perform investigating a qualitative change given to a T cell by the amino acid substitution of an antigen peptide by the approach already learned. By for example, the method of permuting the specific amino acid in the multiplex epitope peptide of this invention by the amino acid which carried out 1 resemblance Asp Glu Asn Gln Lys Arg Phe Tyr Ile Leu Gly Ala Thr Ser Compound the permuted analog peptide and the proliferation potential of a T cell, or the production ability of lymphokine by the method of permuting by the amino acid which has not carried out 2 resemblance in comparison with the peptide of a basis A polar amino acid and a hydrophilic amino acid are hydrophobic amino acid. Ala Hydrophobic amino acid is a hydrophilic amino acid. Ser It permutes and compares with the peptide of a basis. Thus, with the obtained analog peptide, equivalent multiplex epitope peptides (a significance characteristic, T cell activation ability, etc.) are also immunologically included by this invention with the multiplex epitope peptide of this invention.

[0031]

Cry j 1 or -- Cry j 2 The antigen peptide of the origin, and T cell which reacts Th2 Th0 There is much what has a property (drawing 3, drawing 4). By the way, a BCG vaccine prevents the infection from a tubercule bacillus by carrying out activation of the cellular immunity ability. In order to carry out activation of the cellular immunity Th1 Although the T cell of a type must be guided, if the property of the human T cell clone which carried out BCG immunization is examined Th1 It is reported that there are many T cells of a type (the Matsushita \*\*, 45th Japanese Society of Allergology, 836 pages, 1995). According to the report of Matsushita, it is HLA-DR14 (DRB 1\*1405). It is a tubercule bacillus to constraint nature. BCGa 84-100 of protein Amino acid sequence (EEYLILSARDVLAVVSK) Th1 to recognize A clone exists. Then, DPA1\*0101-DPB 1\*0501 which is the HLA haplotype which 60% or more of Japanese people have The T cell epitope of constraint nature is chosen (for example, the Cry j 1 No. 43 peptide (p211-225) / KSMKVTVAFNQFGPN of drawing 1 ). It is DRB 1\*1405 about this peptide. Tubercule bacillus of constraint nature BCGa 84-100 of protein Multiplex epitope peptide EEYLILSARDVLAVVSKRRMKVTVAFNQFGPN connected with the T cell epitope DRB 1\*1405 It is thought that the probability to ask a hay fever patient with haplotype becomes quite high, if such a multiplex epitope peptide is used -- BCGa Antigen origin peptide Th1 lymphokine -- especially -- IL-12 Production is expectable. IL-12 are IL-4. It has an opposite operation. In a T cell, it is \*\*\*\*\*. Th cell Th1 Differentiation Guiding is known for many Homo sapiens and the example of a mouse (et al.: ). [ et al./ Manetti, R., and /: ] [ J.Exp.Med., 177, 1199-1204, 1993; Wu, C., ] J.Immunol., 151, 1938-1949, 1993; Hsieh, C., et al.: Science, 260, 547-549, 1993. especially -- Manetti etc. -- in an experimental result, it is one of the tick allergen Der p 1 an antigen -- a specific T cell clone -- usually -- Th2 although guided -- IL-12 The bottom of existence Th1 or -- Th0 It is supposed that it is guided. therefore, Th1 using the multiplex epitope peptide which combined a T cell epitope and the T cell epitope of allergen reactivity with induction potency -- original Th2 Inductive T cell Th1 or -- Th0 Being guided to the T cell of a type is expected.

[0032]

When the peptide containing at least one T cell epitope of Cry j 1 of this invention and/or Cry j 2 was administered hypodermically to the mouse and it is exposed to subsequent cedar pollen allergen, T cell ANAII arises ( drawing 13 , 14), and the amount of IL-2 production also falls intentionally as compared with a control group. There is a report (J.Allergy Clin.Immunol.76: 188, 1985) that IL-2 decrease in the case of a human desensitization therapy. Furthermore, the multiplex epitope peptide of this invention activates each of a T cell clone to the T cell each epitope peptide which constitutes the peptide concerned ( drawing 10 ), and does not react with a patient IgE antibody ( drawing 8 ). The multiplex epitope peptide of this invention guides immunological tolerance to allergen, and these results show the usefulness as a peptide immunotherapy agent of the allergosis. this invention multiplex epitope peptide can be prescribed for the patient with the support or the diluent which can be permitted pharmaceutically. The effective dose changes to extent of the susceptibility over cedar pollen allergen, age, sex and a patient's weight, and a list according to factors, such as capacity of the peptide which pulls out the immune response in a patient.

[0033]

A route of administration can be prescribed for the patient by simple approaches, such as injection (hypodermically, intravenous), rhinenchysis, instillation, taking orally, inhalation, and transderma.

[0034]

In addition, the notation by one literal notation of the amino acid in this specification and an array table is taken as the notation enacted by the IUPAC biochemistry naming committee (refer to the 1468 page (2nd edition) table 1.1 of biochemistry lexicons).

[Example 1]

[0035]

Cry j1 and Cry j2 using T cell Rhine Identification of a T cell epitope

The 18 hay fever patient peripheral blood lymphocyte was stimulated by Cry j1 or Cry j2 which are cedar pollen allergen, and T cell Rhine which recognizes each allergen specifically was established according to the patient.

[0036]

96- a well -- mitomycin-C processing was carried out on the plate culture plate In the RPMI-1640 culture medium containing 0.2ml 15% blood serum, 5x10<sup>4</sup> self-origin B cell stocks, the overlapping peptide of 2microM, and 2x10<sup>4</sup> T cell Rhine were cultivated for two days, and were cultivated after adding 0.5microcurie [3H] thymidine for further 18 hours. After carrying out the collection of the cell to a glass filter by the cell harvester, the amount of intracellular incorporation of [3H] thymidine was measured with the liquid scintillation counter. The case where the value (a modal participation factor/Stimulation Index) acquired by breaking the value of intracellular incorporation of [3H] thymidine at the time of adding a peptide by the value of the amount of intracellular incorporation of the contrast [3H] thymidine which does not add a peptide is two or more is defined as having recognized the added peptide as an antigen peptide.

[0037]

In Cry j 1, the T cell epitope part on the Cry j 1 molecule which each patient recognizes was an average of 9.8, and the range was 4 <= epitope number <=15. On the other hand, in Cry j 2, it was an average of 8.7, and the range was 2 <= epitope number <=13. Since Cry j 1 consists of 353 amino acid and Cry j 2 consists of 379 amino acid, about 2.3-2.8 T cell epitope parts will exist per 100 amino acid residue.

[0038]

It is predicted that the T cell epitopes recognized differ for every HLA-class II type since it is thought that HLA-class II types differ for every patient. Therefore, the map of the antigen peptide which each patient recognizes was carried out for every patient. Consequently, Cry j 1 and Cry j 2 On dyad, the epitope parts which may be recognized by each patient differed. On an allergen molecule, the part which is hard to recognize to be the part which tends to be recognized by the individual as a T cell epitope exists. Moreover, since the reproductive rates of a T cell differ for every T cell epitope, the judgment of what may select any antigen peptide is not made to the design of a multiplex epitope only on this epitope map. Then, the "significance characteristic" which shows a predominance for every epitope was computed by [ of the patient who computes / patients / 18 / an average modal participation factor about an antigen peptide in case a modal participation factor comes out two or more, and holds the antigen peptide concerned to this value ] applying comparatively (frequency of occurrence) (the [ international public presentation ] refer to No. 94/01560).

[0039]

The result is shown in drawing 1 and drawing 2 . In Cry j 1, a significance characteristic shows a peak price by 679, and, as for the characteristic of 578 and the peptide number of No. 4, the characteristic of the peptide number of No. 22 continues [ the peptide number of No. 43 (p211-225) ]

with 373. In Cry j 2, the characteristic of the peptide number of No. 14 shows a peak price by 709, and the characteristic of 680 and the peptide number 48 continues [ the characteristic of the peptide number of No. 38 ] with 370. Although there is the approach of selecting one antigen peptide with a high significance characteristic, and using it as peptide immunotherapy when peptide immunotherapy is taken into consideration, effectiveness can be expected only by 72% of patient also by No.22 of Cry j 1 which is the highest peptide of the frequency of occurrence, or the case of No.43, but the actual ratio of consumed water will fall further. In order to gather a ratio of consumed water, there is the need of combining some T cell epitopes. In this case, although what has a high significance characteristic becomes selection of a T cell epitope with a candidate, however it may choose only an epitope with a high significance characteristic, if the HLA class II molecule which presents these epitopes as an antigen is the same, a ratio of consumed water cannot be gathered. Therefore, it is necessary to identify the type of the HLA class II molecule which presents a T cell epitope peptide.

[Example 2]

[0040]

Identification of the T cell epitope peptide which a T cell clone recognizes

Patient 2 who recognizes No. 22 to be the peptide number of No. 43 which shows a high significance characteristic in Cry j 1 in 18 hay fever patients Name [patient B (it omits Following PB) The peptide number of No. 14 which shows a high significance characteristic in patient J(PJ)] and Cry j 2, Patient trinomial [PB, Patient C (PC) who recognize No. 38, No. 48, and No. 69 The T cell clone which selects patient R(PR)], stimulates these hay fever patients' peripheral blood lymphocyte by Cry j1 or Cry j2, and recognizes Cry j1 or Cry j2 was established. HLA-class I and class II type of four patients are shown below.

PB:A2/24-B39/55-Cw7/w3-DRB1\*1501/0901-DRB4\*0101-DRB 5\*0101,

DQA1\*0102/0301-DQB1\*0602/0303-DPA1\*0101/0101-DPB1\*0501/0201,

PJ:A24/--B61/51-Cw3/--DRB1\*1501/0802-DRB 5\*0101, DQA1\*0102/0401-DQB1\*0602/0402-DPA1\*--/--DPB1\*0501/0402,

PC:A-2/2-B54/51-Cw1/-,

DRB1\*0405/1501-DRB4\*0101-DRB5\*0101-DQA1\*0301/0102-DQB1\*0401/0602-DPA1\*0202/0202-DPB1\*0201/0501,

PR:A-11/--B60/35-Cw7/w3-DRB1\*0901/1501-DRB4\*0101-DRB5\*0101-DQA1\*0301/0102-DQB1\*0303/0602-DPA1\*01/0202-DPB1\*0201/0201

[0041]

A total of 14 kinds of T cell clones which recognize Cry j 1 specifically was established from a total of 35 kinds from PB origin peripheral blood lymphocyte, and PJ origin peripheral blood lymphocyte. Similarly, 17 kinds of T cell clones which recognize Cry j 2 specifically were established from a total of 31 kinds from PB origin peripheral blood lymphocyte, ten kinds from PC origin peripheral blood lymphocyte, and PR origin peripheral blood lymphocyte. Since all of these T cell clones were CD3+, CD4+, CD8-, TCR\*\*\*\*+, and TCRgammadelta-, it became clear that a restricted molecule was an HLA-class II molecule. 96- a well -- 5x104 self-origin B cell stocks, the overlapping peptide of 2microM, and 2x104 T cell clones which carried out mitomycin-C processing on the micro culture plate In the RPMI-1640 culture medium containing 0.2ml 15% blood serum, it cultivated for two days and cultivated after adding 0.5microcurie [3H] thymidine for further 18 hours. After carrying out the collection of the cell to a glass filter by the cell harvester, intracellular incorporation of [3H] thymidine was measured with the liquid scintillation counter. By this actuation, the T cell epitope which a T cell each clone recognizes was identified.

[0042]

The growth response was shown to the peptide stimulus containing an antigen 69% (34/49) in the T cell clone which recognizes produced Cry j 1, and the antigen peptide has been identified. Similarly, in 69% (40/58), the antigen peptide has been identified in the T cell clone which recognizes Cry j 2. The T cell clone the T cell clone which recognizes Cry j 1 specifically recognizes the peptide numbers 4, 13, 19, 22, 30, 31, 39, and 43, No. 51 or 66, and Cry j 2 to be to unique \*\* recognized the peptide numbers 4, 8, 14, 17, 31, 37, 38, 48, 65, 66, and 68 and No. 69 or 70. The result was summarized to [drawing 3](#) and [drawing 4](#) .

[Example 3]

[0043]

Identification of the HLA class II restricted molecule in locus level

To the growth response system of the T cell clone established in the example 2, it is the HLA-class II. The HLA class II restricted molecule in locus level was identified by adding the monoclonal antibody which reacts specifically to DR, DQ, or DP, and preventing the growth response of a T cell.

[0044]

96- a well -- 2x104 self-origin B cell stocks which carried out mitomycin-C processing on the micro culture plate -- The overlapping peptide of 2microM, 3microg [ml ] \*\* DR, DQ, Or RPMI-1640 which contains 15% blood serum of 0 and 2 ml for DP monoclonal antibody (BEKUTON/product made from DIKKINSON), and 2x104 T cell clones In culture medium, it cultivated for two days and cultivated after adding 0.5microcurie [3H] thymidine for further 18 hours. After carrying out the collection of the cell to a glass filter by the cell harvester, intracellular incorporation of [3H] thymidine was measured with the liquid scintillation counter. A result is shown in [drawing 5](#) . The restricted molecule of Cry j [ this drawing to ] one p106-120, Cry j two p66-80, and Cry j 2 p186 -200 peptide is DR and Cry j two p341-355. It turns out that the restricted molecule of DQ, Cry j one p211-225, and Cry j two p181-195 of the restricted molecule of a peptide is DP. It analyzed similarly about the restricted molecule of other T cell clones (refer to [drawing 3](#) and [drawing 4](#) ).

[Example 4]

[0045]

Identification of the restricted molecule in each type of an HLA class II molecule

Identification of the restricted molecule in each type is possible by using the B cell stock which corresponds the T cell clone which has identified the restricted molecule in HLA class II locus level about a type about the mouse L-cell which carried out transgenics of each type about DR, and DQ or DP as an antigen presenting cell.

[0046]

96- a well -- the 5x104 mice L-cell which carried out mitomycin-C processing on the micro culture plate -- Or the B cell stock corresponding [ haplotype's ], the overlapping peptide of 2microM, The 3microg [ml ] anti-D R and DQ or DP monoclonal antibody (BEKUTON/product made from DIKKINSON), In the RPMI-1640 culture medium containing 15% blood serum of 0.2 ml, 2x104 T cell clones were cultivated for two days, and were cultivated after adding 0.5microcurie [3H] thymidine for further 18 hours. After carrying out the collection of the cell to a glass filter by the cell harvester, intracellular incorporation of [3H] thymidine was measured with the liquid scintillation counter.

[0047]

A restricted molecule can be identified when the growth response of a T cell clone is observed. Cry j 1 p106 -120 peptide The restricted molecule to show DRB 5\*0101 and Cry j 1 p211 -225 peptide The restricted molecule to show DPA1\*0101- DPB 1\*0501 and Cry j 2 p66 -80 peptide Restricted molecule to show DRB 5\*0101 and Cry j 2 p181 -195 peptide The restricted molecule to show DPA1\*0101- The restricted molecule with which the restricted molecule which presents PDB 1\*0201 and Cry j 2 p186 -200 peptide presents DRB 4\*0101 and Cry j 2 p341 -355 peptide was DQA1\*0102-DQB 1\*0602 ( [drawing 6](#) ). The analysis result about other epitope parts is indicated by [drawing 3](#) and [drawing 4](#) .

[Example 5]

[0048]

Th type identification of a T cell clone

The intervention of Th2 cell is assumed by the onset of allergy. Whether on current research level, the differentiation to Th [ of a T cell ]1 or Th2 cell is prescribed by a specific epitope peptide or HLA-class II locus level after an antigen stimulus still has many unsolved parts. However, when

Th2 cell is guided to dominance after a stimulus with a peptide, possibility that hay fever will get worse by peptide administration is high. The T cell clone produced in the example 2 was stimulated with the epitope peptide which a T cell recognizes, and Th type was determined by measuring the amount of production of IL-2, IL-4, and IFNgamma.

[0049]

24- a well -- 1x10<sup>5</sup> self-origin B cell stocks which carried out mitomycin-C processing on the micro culture plate, the epitope peptide of 2microM, and 5x10<sup>5</sup> T cell clones were cultivated for 24 hours in the RPMI-1640 culture medium which contains a Homo sapiens blood serum 10 1ml%. The cell was settled by centrifugal and the culture supernatant was obtained. IL-2 in a culture supernatant, IL-4, and IFNgamma were measured by ELISA kit [IL-2(R&D shrine make)] IL-4 (MEDOJIE Knicks make) of marketing, and IFNgamma (made in the Otsuka assay lab).

[0050]

IL-2, IL-4, and the amount of IFNgamma which a T cell each clone produces are shown in [drawing 3](#) and [drawing 4](#). Although 1 and Th0 cell were [ 12 and Th1 cell ] 16 for Th2 cell and the T cell clone which recognizes Cry j 1 had more Th2 than Th1, 10 and Th1 cell were 8 and had [ the T cell clone which recognizes Cry j 2 / Th2 and Th1 ] 8 and Th0 cell comparable [ Th2 cell ]. If the T cell epitope which each T cell clone recognizes, a restricted molecule, and Th type are compared, by each T cell clone, Th2 and Th1 differ from Th0 type, and Th2 cell and Th1 cell are found out by some T cell clones which recognize the same epitope and the same antigen presentation molecule. In these results, the differentiation to Th2, Th1, or Th0 cell of the T cell after Cry j 1 or Cry j 2 stimulus means what is not specified in the combination of a specific T cell epitope and a specific restricted molecule. That is, it became clear that all peptides including a T cell epitope part could serve as a candidate of the multiplex epitope peptide of this invention.

[Example 6]

[0051]

Production of a multiplex epitope peptide

Cry j 1 and Cry j 2 Although the IgE epitope which recognizes this primary structure became clear [ not existing and that at least four IgE antibody epitopes exist in Cry j 2 ] at Cry j 1 as a result of identifying the IgE antibody epitope part which exists in dyad, these IgE antibody epitope parts were parts where T cell epitope parts differ. Based on this knowledge, the peptide shown in [drawing 7](#) among the T cell epitope parts of Cry j1 and Cry j2 was chosen.

[0052]

the peptides a and b of [drawing 7](#) -- respectively -- peptide No. of Cry j 1 of [drawing 1](#) -- corresponding to 43 and 22, Peptide c corresponds to No.14 of Cry j 2 of [drawing 2](#), and d and e consist of some of 37-38 of Cry j 2 of [drawing 2](#), and amino acid of 69-71, respectively.

[0053]

When connecting five kinds of these peptides to a serial and producing a multiplex epitope peptide, the multiplex epitope peptide which fixed two peptides, and a and b in order of a-b, and connected the three remaining peptides (c, d, and e) at random, and inserted the array of Arg-Arg between each peptide becomes the six following kinds.

C.A.#1.a-Arg-Arg-b-Arg-Arg-c-Arg-Arg-d-Arg-Arg-e

C.A.#2.a-Arg-Arg-b-Arg-Arg-c-Arg-Arg-e-Arg-Arg-d

C.A.#3.a-Arg-Arg-b-Arg-Arg-d-Arg-Arg-c-Arg-Arg-e

C.A.#4.a-Arg-Arg-b-Arg-Arg-d-Arg-Arg-e-Arg-Arg-c

C.A.#5.a-Arg-Arg-b-Arg-Arg-e-Arg-Arg-c-Arg-Arg-d

C.A.#6.a-Arg-Arg-b-Arg-Arg-e-Arg-Arg-d-Arg-Arg-c

[Example 7]

[0054]

Reactivity over the Homo sapiens IgE antibody of a multiplex epitope peptide

Six sorts of multiplex epitope peptides (C. A.#1-#6) obtained in the example 6 were dissolved in the 0.2M acetic-acid buffer solution (pH4.5), and, in addition to the black plate (Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd. make), it was left at 4 degrees C by 0.1ml / well overnight. After removing an antigen solution, it washed 3 times by the penetrant remover, 29 cedar pollen patients and a healthy man blood serum (4 time dilution) were added, and it was made to react at 37 degrees C for 4 hours. It washed 3 times by the penetrant remover after removing a blood serum, and the beta-D-galactosidase indicator anti-Homo sapiens IgE antibody (product made from Pharmacia) was made to react at a room temperature overnight. It is after 3 times washing, and 0.1mM 4-methyl umbelliferyl-beta-D-galactopyranoside / 0.01M at a penetrant remover. A phosphate buffer solution (pH 7.0), 0.1M NaCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% NaN<sub>3</sub>, and the substrate solution of 0.1%BSA were added, and it was made to react at 37 degrees C for 2 hours. 0.1M Glycine/NaOH, and pH10.3 solution was added to this, the reaction was stopped, and fluorescence intensity was measured with the spectrophotofluorometer (Labsystems). In addition, the biotin indicator rabbit anti-d epitope IgG and galactosidase indicator streptavidin (pierced earring company make) were made to react as electropositive control to each multiplex epitope peptide.

[0055]

Consequently, the fluorescence intensity of all 29 persons' Homo sapiens blood serums was 3-5 about six sorts of all multiplex epitope peptides (C. A.#1-#6) (a blank value is 3 or 4). On the other hand, for 14 persons and 10 or more, the number of 1,000 or more fluorescence intensity was [ six persons and 100 or more / four persons and 9 or less ] five at Cry j 1 which is the antigen extracted and refined from cedar pollen. On the other hand, rabbit anti-d epitope peptide IgG showed 3,000 or more to six sorts of consensus allergen (a blank value is 230 in 112 and Cry j 1 allergen). From the above thing, the multiplex epitope peptide was not substantially combined with a hay fever patient's allergen specific IgE antibody, and it became clear that the connection sequence of each epitope did not affect reactivity with a Homo sapiens IgE antibody ( [drawing 8](#) ).

[Example 8]

[0056]

Existence of recognition of the T cell epitope of a multiplex epitope peptide

It examined whether the antigen peptide which constitutes C.A.#4 among the multiplex epitope peptides obtained in the example 6 would actually function as a T cell epitope.

[0057]

96- a well -- 5x10<sup>4</sup> self-origin B cell stocks and 2x10<sup>4</sup> T cell clones which carried out mitomycin-C processing on the micro culture plate in the RPMI-1640 culture medium containing 0.2ml 15% blood serum Each antigen peptide which constitutes 50micro ag [ /ml ] Cry j 1, 2microg [ /ml ] Cry j 2, and multiplex epitope peptide C.A.#4 as an antigen, Or it cultivated for two days with either of the 10microg [ which was produced by gene expression //ml ] C.A.#4 multiplex epitope peptides, and cultivated after adding 0.5microcurie [3H] thymidine for further 16 hours. After carrying out the collection of the cell to a glass filter by the cell harvester, intracellular incorporation of [3H] thymidine was measured with the liquid scintillation counter. A result is shown in [drawing 9](#).

[0058]

Cry j one p106-120 The T cell clone PB 8-3 to recognize, the T cell clone PB 8-34 which recognizes Cry j one p211-225, the T cell clone PB 4-22 which recognizes Cry j two p66-80, and Cry j two p181-195 The T cell clone PB 14-5 to recognize and the T cell clone PB 14-34 which recognizes Cry j two p186-200 have all often reacted to an antigen peptide. On the other hand, the T cell clone is carrying out the growth response also of the case of a multiplex epitope peptide by the same strength as each peptide. About the T cell clone PB 14-19 which recognizes Cry j two p341-355, a little weak growth response was observed to the multiplex epitope peptide stimulus.

[0059]

The antigen peptide with which the above result is included in a multiplex epitope peptide often functions as an epitope respectively, and holding

the capacity which activates a T cell is shown.

[Example 9]

[0060]

The growth response of the hay fever patient peripheral blood lymphocyte by the multiplex epitope peptide

Since it includes a T cell epitope part, the multiplex epitope peptide needs making a growth response cause in a peripheral blood lymphocyte, when trying peptide immunotherapy. The peripheral blood lymphocyte was stimulated with the multiplex epitope peptide, and it investigated about whether a growth response is observed.

[0061]

96after suspending hay fever patient or healthy people origin peripheral blood lymphocyte in RPMI-1640 culture medium which contains Homo sapiens blood serum 10% -- a well -- a circular culture plate -- each -- seeding was carried out so that it might be set to 2.5x10<sup>5</sup> pieces / 200microl to a well. Array number: The multiplex epitope peptide added so that the 0.001-20microg [ /ml ] last concentration and Cry j 1 might become in 50microg [ ml ] /and Cry j 2 might become in 2microg/ml, and either [ the multiplex epitope peptide of 1 and ] Cry j1 or Cry j2 were cultivated for six days. 0.5microcurie [3H] thymidine was added and it cultivated for further 16 hours. After carrying out the collection of the cell to a glass filter by the cell harvester, intracellular incorporation of [3H] thymidine was measured with the liquid scintillation counter.

[0062]

Five persons' peripheral blood lymphocyte showed the growth response to the multiplex epitope peptide in six patients. The peripheral blood lymphocyte of one patient and a healthy person binary name did not show a growth response ( drawing 10 ).

[0063]

The growth response of a peripheral blood lymphocyte began to take place by 0.1microg [ /ml ] multiplex epitope peptide stimulus, and the growth response increased in proportion to the dose. It was judged that the concentration of the multiplex epitope peptide which guides T cell growth response sufficient by in vitro from this result was 10micro more than /ml.

[0064]

the healthy person origin peripheral blood lymphocyte of 17 hay fever patients and a binary name -- 10microg [ /ml ] array number: -- it stimulated with the multiplex epitope peptide of 1, and the T cell response was calculated. T cell growth competence was not observed in healthy people's peripheral blood lymphocyte. In 17 patients, incorporation of 9,652cpm [ a maximum of ] [3H] thymidine was observed. Incorporation of [3H] thymidine of a peripheral blood lymphocyte without an antigen stimulus was calculated with 1, the incorporation value of [3H] thymidine of the peripheral blood lymphocyte under antigen existence was expressed with the modal participation factor (SI), and the result was shown in drawing 11 . In order to consider that more than SI>2 is a positivity in the case of identification of a T cell epitope, when it decided to regard more than SI>2 as the growth response having been observed to the peptide similarly, the growth response was seen by 13 persons (76.5%) in 17 patients. It is judged with there being effectiveness of peptide immunotherapy in 76.5% of patient from this result, when a hay fever patient is medicated with a peptide.

[0065]

When trying peptide immunotherapy with the multiplex epitope peptide of this invention to a hay fever patient, beforehand, the growth competence to the multiplex epitope peptide of a patient origin peripheral blood lymphocyte can be investigated, and the patient by whom a growth response is looked at can be selected. It is thought that it can judge whether the peptide immunotherapy using a multiplex epitope peptide can apply to that patient by this trial, and a certain amount of [ curative effect ] prediction can do it from the high level of growth competence.

[Example 10]

[0066]

Induction of the immunological tolerance by the cedar pollen allergen administration using a mouse

It does not understand for details about the so-called mechanism of the hyposensitization therapy which treats by prescribing Japan cedar allergen for the patient. Then, the animal experiment using a mouse was conducted. Cedar pollen allergen and Cry j 1 Hypodermically [ of 300microg and CB6F1 mouse (a female, five animals) ] was medicated twice at intervals of five days per animal. It is this capacity as control. PBS It administered hypodermically (a female, five animals). further -- five days after Cry j 1 100microg Alum an AJU band -- hypodermically -- prescribing a medicine for the patient -- immunity -- carrying out -- further -- ten days after -- a lymph gland cell -- isolating -- the lymph gland cell of a control group mouse, and Cry j 1 The lymph gland cell of an administration mouse was pooled in each group unit. To the pooled lymphocyte Cry j 1 0, 50, and 150 mug/ml In addition, culture is performed for three more days, and a culture supernatant is extracted and it is contained. IL-2 It measured (Endogen shrine make). The result is shown in drawing 12 . It is a control group. PBS Administration mouse Cry j 1 Concentration 0, 50, and 150 mug/ml While increasing IL-2 The amount of production increased. On the other hand, it is Cry j 1. It compares with these control mice and an administration mouse is for whether it being \*\*. IL-2 The amount of production decreased and immunological tolerance arose by cedar pollen allergen administration. This result is reproducing the effective example of the desensitization therapy by the cedar pollen allergen used now.

[Example 11]

[0067]

Identification of the T cell epitope of CB6F1 mouse

Male CB6F1 8-weeks old mouse was rearranged with the adjuvant (Imject Alum: pierced earring company make), and 3 times immunity was carried out every two weeks by Cry j 2(rCry j 2) 10microg (ip). Splenic cells were prepared from three mice after [ of the last immunity ] one week, and it collected into one. the overlapping peptide (0.115microm) of 74 kinds of Cry j 2 which consists splenic cells (5x10<sup>6</sup>) of 15 residue to plate (falcon company make) 1 well 96 well -- respectively -- \*\* -- it both cultivated by the 0.2ml RPMI culture medium (10% FCS, 2mM L-glutamine, and 50U/ml penicillin and 50microg/ml streptomycin). The reaction to each of PBS, 50microg/ml Cry j 1, and 0.3microg/ml rCry j 2 was also considered as contrast. Seeding was carried out 3 well to each trial reagent, and 37 degrees C was cultivated for three days under CO<sub>2</sub> conditions 5%. The pulse label was performed by the [3H]-thymidine of the last 6-hour 0.5microcurie / well, and after carrying out the collection of the cell on the glass filter and drying by the cell harvester (Inotech, product made from belt-RUDOJAPAN), intracellular incorporation of [3H]-thymidine was measured with the liquid scintillation counter (TRI-CARB 4530, product made from packer-DOJAPAN).

[0068]

Although CB6F1 mouse which carried out immunity by rCry j 2 showed reactivity strong against rCry j 2 which is an antigen, it did not react to Cry j 1 which is another cedar pollen main allergen, but it was checked that this system is an antigen specific reaction. And CB6F1 mouse which carried out immunity by rCry j 2 showed responsibility remarkable in No.14 peptide and No.48 peptide which are shown in drawing 2 among 74 kinds of investigated overlapping peptides. It was shown that the peptide of No.14 and No.48 is participating in antigen presentation as a main T cell epitope in CB6F1 mouse from this. Even if Homo sapiens had, since the peptide of No.14 and No.48 was a main T cell epitope peptide, it was judged that CB6F1 mouse can become a useful model animal when evaluating the effectiveness of the peptide used for the peptide immunotherapy over cedar pollen.

[Example 12]

[0069]

The immune response in in vivo one of antigen peptide No.14

3mg No.14 peptide which dissolved in the physiological saline per male CB6F1 (8 weeks old, male) mouse of one groups [ eight ] was administered twice hypodermically at intervals of five days. As a control group, the physiological saline of the amount of isochore (200microl) was similarly prescribed for the patient. Hypodermically immunity of all the mice was carried out after the 2nd peptide administration on the 5th by rCry j 2 (50microg/(animal)) mixed with the injection alm (Imject Alum). Splenic cells were prepared from each mouse after one week of immunity. Splenic

cells (5x10<sup>6</sup>) were cultivated with rCry j 2 (3microg/(ml)) to plate (falcon) 1 well by the 0.2ml RPMI culture medium (10% FCS, 2mM L-glutamine, and 50U/ml penicillin and 50microg/ml streptomycin) 96 well. It cultivated under the conditions which do not contain rCry j 2 as contrast. Measurement of the T cell growth by 3H-thymidine was performed according to the approach indicated by the example 1. Cytokine measurement used the culture supernatant when stimulating by 0.3microg [/ml] Cry j 2 by in vitro about three kinds of peptide administration groups (0, 3, 1.3, and 10 microg/ml) including contrast.

[0070]

the antigen stimulus by rCry j 2 which will continue if No.14 peptide is beforehand administered hypodermically to CB6F1 mouse -- receiving -- the immune response nature of a T cell -- a physiological saline administration group -- comparing -- being significant (p< 0.01) -- it was controlled ( [drawing 13](#) ). About IL-2 production, it decreased in three kinds of peptide administration groups more nearly intentionally than a control group, respectively. In the model system of a mouse, it was shown from this that No.14 peptide has the preventive effect of peptide immunotherapy to cedar pollen allergy.

[Example 13]

[0071]

The immune response in in vivo one of antigen peptide No.48

3mg No.48 peptide which dissolved in the physiological saline per male CB6F1 6-weeks old mouse was administered twice hypodermically at intervals of five days. Control group If carried out, the physiological saline of the amount of isochore (200microl) was similarly prescribed for the patient. The number of animals of a peptide administration group and a control group was respectively made into eight animals, and carried out hypodermically immunity of all the mice by rCry j 2 (50microg) mixed with the adjuvant (Imject Alum) from the 2nd peptide administration on the 5th. Splenic cells were prepared from each mouse after one week of immunity. Splenic cells (5x10<sup>6</sup>) were cultivated with rCry j 2 (3microg/(ml)) to plate (falcon) 1 well by the 0.2ml RPMI culture medium (10% FCS, 2mM L-glutamine, 50U/ml penicillin, 50microg [/ml] streptomycin) 96 well. It cultivated under the conditions which do not contain rCry j 2 as contrast. Measurement of the T cell growth by 3H-thymidine was performed according to the approach indicated by the example 10.

[0072]

The immune response nature of a T cell was intentionally controlled compared with the physiological saline administration group to the antigen stimulus by rCry j 2 which will continue if No.48 peptide is beforehand administered hypodermically to CB6F1 mouse (p< 0.05). In the model system of a mouse, it was shown from this that No.48 peptide has a preventive effect by peptide immunotherapy to cedar pollen allergy ( [drawing 14](#) ).

[0073]

It became clear that it is the operation mechanism the desensitization therapy by the cedar pollen extract extractives in the Homo sapiens to whom it has been carried out conventionally minded the T cell epitope from the above experimental result.

[Example 14]

[0074]

Decision of a core array

Cry j 1 In order to determine an amino acid sequence (core) required for T cell Rhine and a T cell clone growth response of the peptide number of No. 22 (p106-120) As shown in [drawing 15](#), every 1 residue amino acid is deleted from the amino terminal and C terminal of this peptide. p107-120 (p22-2), p108-120 (p22-3), p109-120 (p22-4), p110-120 (p22-5), p111-120 (p22-6), p106-119 (p22-7), p106-118 (p22-8), p106-117 (p22-9), p106-116 (p22-10), and 11 kinds of peptides of p106-115 (p22-11) were compounded with the peptide synthesis machine (PSSM-8, Shimadzu make). p106-120 of the Cry j 1 peptide number of No. 22 T cell Rhine (PJ, PR, and PB) of the hay fever patient of the trinomial which reacts and one patient's T cell clone (PB 8-3, PB 8-2, and PB 9-39) The reactivity over these 11 kinds of peptides was examined using the approach of examples 1 and 2. Although two kinds of T cell Rhine (PJ, PB) and two kinds of T cell clones (PB 8-2 and PB 9-39) have recognized p106-120 (p22-1) and propagated, one kind of T cell Rhine and a T cell clone did not show a growth response ([drawing 15](#)). Consequently, it became clear that a p106-120 core array was 9 residue of "FIKRVSNVI" (array number: 4) (this 9 residue is displayed as Cry j 1 #22 core).

[Example 15]

[0075]

The multiplex epitope peptide containing cedar pollen and a cypress pollen allergen origin T cell epitope

Cypress pollen allergen Cha o 1 The peptide number 8 (p71-90; IFSKNLNKLNMPYIAGNK) which is a T cell epitope (Japanese Patent Application No. No. 153527 [ eight to ]), or the peptide number 32 ( ) [ P311-330; ] Two kinds ( ) of peptides which connected the Cry j 1#22 core array "FIKRVSNVI" acquired in SSGKNEGNTNIYNNNEAFKVE and the example 14 [ Cha o 1#8-Cry j i #22 core, ] [ Cha ] o 1 #32-Cry j 1 #22 core was compounded with the peptide synthesis machine (PSSM-8; Shimadzu make). Between Cha o 1#8, Cry j 1#22 core and Cha o 1#32, and Cry j 1#22 core(s) RR The array was inserted, namely, -- Cha o 1 #8-Cry j 1 #22 core (array number: 5) It is Cha o 1#32-Cry j 1 #22 core (array number: 6).

[0076]

Cry j 1 specific T cell Rhine and Cha o 1 specific T cell Rhine were produced from the hay fever patient and the cypress hay fever sufferer, respectively. Cry j 1 Specific T cell Rhine and Cha o 1 specific T cell Rhine A tubercule-bacillus antigen (PPD) and hemolytic streptococcus cell wall (SCW) An antigen does not react and is Cry j 1. Specific T cell Rhine is Cry j 1#22 or Cry j 1#22 core. Although it reacts Cha o 1#8 It reaches, and does not react in #32 but is Cha o 1. Although specific T cell Rhine reacts in Cha o 1#8 and #32 It did not react with Cry j 1#22 or Cry j 1#22core ( [drawing 16](#) ). On the other hand, each of these T cell Rhine reacted to both the multiplex epitope peptide of array number:5, and the multiplex epitope peptide of array number:6. The multiplex epitope peptide which connected cedar pollen and the T cell epitope of the cypress pollen allergen origin became clear [ that it is effective in the peptide immunotherapy of a hay fever patient and a cypress hay fever sufferer ] from these results.

[Example 16]

[0077]

A growth response and cytokine production of an analog peptide

It examined whether it would be possible to adjust the activity of a T cell using two clones PJ 7-9 and PB 10-18 by permuting the amino acid of the T cell epitope peptide of Cry j 1#22 core. Cry j 1 peptide number 22 No. p106-120 The T cell clone PJ 7-9 which reacts, and PB 10-12 use DRB 5\*0101 as a restricted molecule, and recognize 9 residue of Cry j 1#22core. Peptide p108-120 of 13 residue containing this 9 residue (VFIKRVSNVIHG). The analog peptide which permuted each amino acid of 9 inner residue with two kinds of amino acid of similar amino acid and dissimilar amino acid was compounded ( [drawing 17](#) , 18). And the reactivity of the T cell clone PJ 7-9 to these analog peptides and PB 10-18 was investigated in the amount of incorporation of [3H] thymidine. The cytokine concentration in a reaction solution is R&D Systems. It measured by the shrine cytokine measurement kit. The result was shown in [drawing 17](#) and [drawing 18](#) . Supernatant liquid to which the peptide of 13 residue which has not carried out amino acid substitution was made to react here The amount of incorporation of IFN gamma, IL-4, IL-2, and IL-[3H] of amount [ of 5 ] of production and cell thymidine was made into 100%, respectively. As for 3 of Cry j 1#22core "FIKRVSNVI", each 4 or 6th amino acid part "K", "R", and "S", in the case of seven to PJ9 clone, incorporation of [3H] thymidine and the amount of production of cytokine were remarkably controlled by both similar amino acid substitution, dissimilar amino acid substitution, or dissimilar amino acid substitution, respectively ([drawing 17](#)). Therefore, the amino acid of these parts is HLA through a peptide. It is considered a part important for complex formation of a molecule and a T-cell receptor molecule. 1st amino acid (F) It is similar amino acid. Y even if it permutes -- the amount of incorporation of [3H] thymidine, IL-4, and IL-5 in spite of not accepting change in the amount of incorporation of [3H] thymidine if it permutes by "S" which is dissimilar amino acid although change is not accepted in the amount of production -- IFN gamma The amount of production of IL-2

increased remarkably. It is HLA incorporation of [3H] thymidine was controlled by 1, 2, 3, 4 and 6 of Cry j 1#22core, and the 7 or 8th amino acid substitution in the case of ten to PB18 clone, and the amino acid of these parts minded the peptide. It is considered a part important for complex formation of a molecule and a T-cell receptor molecule. Further 6 and the 7 or 8th amino acid substitution compare with the amount of production of IL-5. IL-2 Production control was accepted (drawing 18). From these results By having increased the amount of production of IFN-gamma, it became clear that it is useful as a therapy agent of allergy. [ "SIKRVSNI which permuted 1st amino acid F of Cry j 1#22core by S" ]

[Availability on industry]

[0078]

Since the multiplex epitope peptide of this invention contains some peptides further shown by different molecule between HLA class II loci (DR, DQ, DP) including the peptide shown by the HLA class II molecule with high gene frequency in an allergic subject ensemble, including the T cell epitope peptide of the different allergen molecule origin, it is the die length of the minimum multiplex epitope peptide, and can expect the peptide immunotherapy to which the number of the patients for effective was expanded.

[0079]

Moreover, when using the multiplex epitope peptide of this invention for an allergic subject and trying peptide immunotherapy, beforehand, the growth competence to this peptide of the peripheral blood lymphocyte of the patient origin can be investigated, and the patient in whom a growth response is caused can be selected. By this investigation, the judgment of whether the peptide immunotherapy by the multiplex epitope peptide can apply to that patient is possible, and it can predict to some extent also about a curative effect from the high level of growth competence.

[Brief Description of the Drawings]

[0080]

[Drawing 1] Drawing 1 is drawing showing the average modal participation factor, the frequency of occurrence, and the significance characteristic (average modal participation factor x frequency of occurrence) to a Cry j 1 overlap peptide of cell Rhine of the hay fever patient origin.

[Drawing 2] Drawing 2 is drawing showing the average modal participation factor, the frequency of occurrence, and the significance characteristic (average modal participation factor x frequency of occurrence) to a Cry j 2 overlap peptide of cell Rhine of the hay fever patient origin.

[Drawing 3] Drawing 3 is drawing showing Th type of the T cell clone which recognizes the complex of the HLA class II type which restrains the antigen peptide of Cry j 1, and the antigen peptide concerned and an HLA class II restricted molecule.

[Drawing 4] Drawing 4 is drawing showing Th type of the T cell clone which recognizes the complex of the HLA class II type which restrains the antigen peptide of Cry j 2, and the antigen peptide concerned and an HLA class II restricted molecule.

[Drawing 5] Drawing 5 is drawing showing the identification result in the locus level (DR, DQ, DP) of the HLA class II molecule combined with an antigen peptide.

[Drawing 6] Drawing 6 is drawing showing the identification result in the allele level of each locus of the HLA class II molecule combined with an antigen peptide.

[Drawing 7] Drawing 7 is drawing showing the antigen peptide linkage array used for the multiplex epitope peptide. the inside a and b of drawing -- Cry j -- No. of 1 -- the peptide of 43 and 22 -- corresponding -- c -- No.14 of Cry j 2 -- corresponding -- d and e -- No. -- it corresponds to 37-38 (p181-200) and No.69-71 (p346-365).

[Drawing 8] Drawing 8 is drawing showing reactivity with Homo sapiens IgE of a multiplex epitope peptide, C.A.#1, C.A.#2, C.A.#3, C.A.#4, C.A.#5, and C.A.#6.

[Drawing 9] Drawing 9 is drawing showing the recognition result of the multiplex epitope peptide by the T cell clone, and the T cell epitope contained in C.A.#4.

[Drawing 10] Drawing 10 is drawing showing the lymphocyte growth competence by the multiplex epitope peptide (array number: 1) stimulus of various concentration to the peripheral blood lymphocyte of a hay fever patient and a healthy person.

[Drawing 11] An array number [ as opposed to the peripheral blood lymphocyte of the healthy person of a binary name, and 17 hay fever patients in drawing 11 ]; It is drawing showing the growth competence by multiplex epitope peptide stimulus of 1.

[Drawing 12] Drawing 12 is drawing showing induction of the immunological tolerance by the cedar pollen allergen Cry j 1 administration to CB6F1 mouse.

[Drawing 13] Drawing 13 is drawing showing the immunological tolerance by No.14 peptide (p66-80) administration of Cry j 2 to CB6F1 mouse.

[Drawing 14] Drawing 14 is drawing showing the immunological tolerance by No.48 peptide (p236-250) administration of Cry j 2 to CB6F1 mouse.

[Drawing 15] Drawing 15 is drawing showing the core amino acid sequence decision of No.22 peptide (p106-120) of Cry j 1.

[Drawing 16] Drawing 16 is drawing showing the reactivity of the lymphocyte of the hay fever patient to the multiplex epitope peptide which consists of a cedar pollen specific T cell epitope peptide and a cypress pollen specific T cell epitope peptide, and a cypress hay fever sufferer.

[Drawing 17] Drawing 17 is drawing showing the growth responsibility of the T cell clone PJ 7-9 to the amino-acid-substitution analog peptide of a Cry j 1#22core peptide, and the amount of cytokine production in that case.

[Drawing 18] Drawing 18 is drawing showing the growth responsibility of the T cell clone PB 10-18 to an analog peptide same as the above, and the amount of production of subsequent cytokine.

[Translation done.]

**\* NOTICES \***

**JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.**

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

**DESCRIPTION OF DRAWINGS**

[Brief Description of the Drawings]

[0080]

[Drawing 1] Drawing 1 is drawing showing the average modal participation factor, the frequency of occurrence, and the significance characteristic (average modal participation factor x frequency of occurrence) to a Cry j 1 overlap peptide of cell Rhine of the hay fever patient origin.

[Drawing 2] Drawing 2 is drawing showing the average modal participation factor, the frequency of occurrence, and the significance characteristic (average modal participation factor x frequency of occurrence) to a Cry j 2 overlap peptide of cell Rhine of the hay fever patient origin.

[Drawing 3] Drawing 3 is drawing showing Th type of the T cell clone which recognizes the complex of the HLA class II type which restrains the antigen peptide of Cry j 1, and the antigen peptide concerned and an HLA class II restricted molecule.

[Drawing 4] Drawing 4 is drawing showing Th type of the T cell clone which recognizes the complex of the HLA class II type which restrains the antigen peptide of Cry j 2, and the antigen peptide concerned and an HLA class II restricted molecule.

[Drawing 5] Drawing 5 is drawing showing the identification result in the locus level (DR, DQ, DP) of the HLA class II molecule combined with an antigen peptide.

[Drawing 6] Drawing 6 is drawing showing the identification result in the allele level of each locus of the HLA class II molecule combined with an antigen peptide.

[Drawing 7] Drawing 7 is drawing showing the antigen peptide linkage array used for the multiplex epitope peptide. the inside a and b of drawing -- Cry j -- No. of 1 -- the peptide of 43 and 22 -- corresponding -- c -- No.14 of Cry j 2 -- corresponding -- d and e -- No. -- it corresponds to 37-38 (p181-200) and No.69-71 (p346-365).



[Drawing 8] Drawing 8 is drawing showing reactivity with Homo sapiens IgE of a multiplex epitope peptide, C.A.#1, C.A.#2, C.A.#3, C.A.#4, C.A.#5, and C.A.#6.

[Drawing 9] Drawing 9 is drawing showing the recognition result of the multiplex epitope peptide by the T cell clone, and the T cell epitope contained in C.A.#4.

[Drawing 10] Drawing 10 is drawing showing the lymphocyte growth competence by the multiplex epitope peptide (array number: 1) stimulus of various concentration to the peripheral blood lymphocyte of a hay fever patient and a healthy person.

[Drawing 11] An array number [ as opposed to the peripheral blood lymphocyte of the healthy person of a binary name, and 17 hay fever patients in drawing 11 ]: It is drawing showing the growth competence by multiplex epitope peptide stimulus of 1.

[Drawing 12] Drawing 12 is drawing showing induction of the immunological tolerance by the cedar pollen allergen Cry j 1 administration to CB6F1 mouse.

[Drawing 13] Drawing 13 is drawing showing the immunological tolerance by No.14 peptide (p66–80) administration of Cry j 2 to CB6F1 mouse.

[Drawing 14] Drawing 14 is drawing showing the immunological tolerance by No.48 peptide (p236–250) administration of Cry j 2 to CB6F1 mouse.

[Drawing 15] Drawing 15 is drawing showing the core amino acid sequence decision of No.22 peptide (p106–120) of Cry j 1.

[Drawing 16] Drawing 16 is drawing showing the reactivity of the lymphocyte of the hay fever patient to the multiplex epitope peptide which consists of a cedar pollen specific T cell epitope peptide and a cypress pollen specific T cell epitope peptide, and a cypress hay fever sufferer.

[Drawing 17] Drawing 17 is drawing showing the growth responsibility of the T cell clone PJ 7–9 to the amino–acid–substitution analog peptide of a Cry j 1#22core peptide, and the amount of cytokine production in that case.

[Drawing 18] Drawing 18 is drawing showing the growth responsibility of the T cell clone PB 10–18 to an analog peptide same as the above, and the amount of production of subsequent cytokine.

[Translation done.]

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**